

UNIVERSITE DE CLERMONT-FERRAND
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année scolaire ~~1965-1966~~ 1966

N° 2 

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 28 mars 1966

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(mention pharmacie)

par

Jean-Jacques BORDERIEUX

Pharmacien

Ancien Interne des Hôpitaux de Clermont-Ferrand

Ancien Assistant à la Faculté

C.E.S. de Sérologie

**RECHERCHES SUR LE DOSAGE DE QUELQUES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES
DANS CERTAINES PRÉPARATIONS MÉDICAMENTEUSES ADMINISTRÉES
PAR VOIE BUCCALE**

Président :

Monsieur le Professeur DASTUGUE

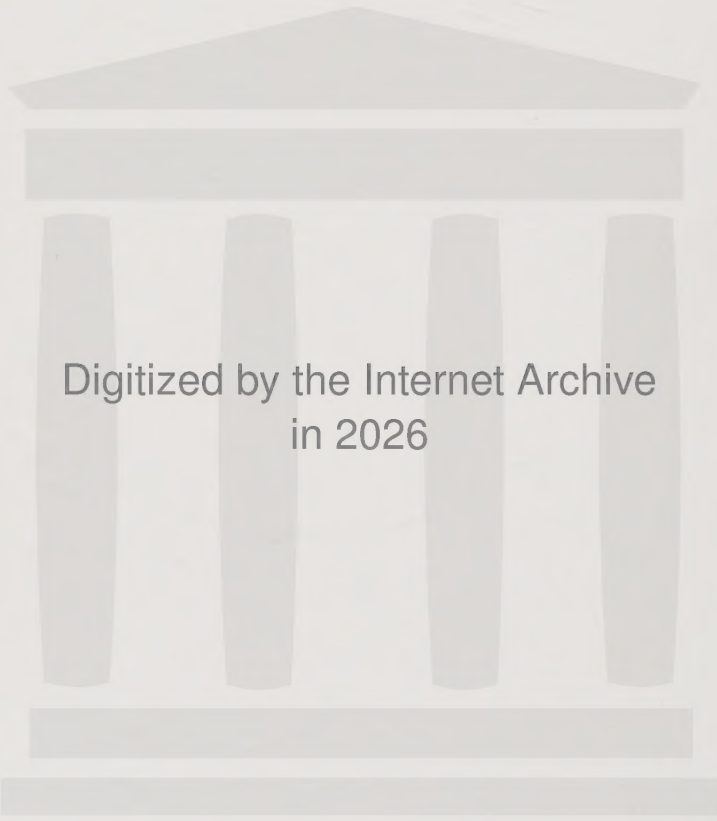
Membres du Jury :

Monsieur le Professeur BASTIDE

Monsieur le Professeur TRONCHE

IMPRIMERIE CHÉRASSE
104 BIS, AVENUE LÉON-BLUM
CLERMONT-FERRAND

1966



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITE DE CLERMONT-FERRAND
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année scolaire 1964-1965

N°

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 28 mars 1966

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(mention pharmacie)

par

Jean-Jacques BORDERIEUX

Pharmacien

Ancien Interne des Hôpitaux de Clermont-Ferrand

Ancien Assistant à la Faculté

C.E.S. de Sérologie

RECHERCHES SUR LE DOSAGE DE QUELQUES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DANS CERTAINES PRÉPARATIONS MÉDICAMENTEUSES ADMINISTRÉES PAR VOIE BUCCALE

Président :

Monsieur le Professeur DASTUGUE

Membres du Jury :

Monsieur le Professeur BASTIDE

Monsieur le Professeur TRONCHE

IMPRIMERIE CHÉRASSE
104 BIS, AVENUE LÉON-BLUM
CLERMONT-FERRAND

1966

UNIVERSITÉ DE CLERMONT
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Directeur honoraire :

M^r MERLE

Doyen :

M^r G. MEYNIEL

Professeurs honoraires :

Mme BLANQUET

MM. BUREAU

FOURNIER

GAUTHIER

LIMOUSIN

POMMÉ

Assesseur :

M^r COULET

I. Professeurs titulaires

MM. BARRIER	Clinique chirurgicale A.
BASTIDE	Chimie biologique et Pharmacodynamie.
BAUDON	Clinique obstétricale.
BERGERON	Pathologie médicale
COULET	Botanique et Microbiologie.
CUVELIER	Hydrologie et Climatologie.
DASTUGUE	Biochimie médicale.
DAUPHIN	Chimie pharmaceutique et Toxicologie.
FEBVRE	Pharmacie galénique.
GRAS	Thérapeutique.
JACQUEMET	Technique chirurgicale.
LATAIX	Pathologie chirurgicale.
MEYNIEL	Biophysique médicale.
MOLINA	Clinique pneumo-phtisiologique.
PETIT	Médecine légale et Médecine sociale.
POROT	Clinique Neurologique et Psychiatrique.
POURRAT	Matière médicale.
ROUHER	Clinique ophtalmologique.
TERRASSE	Clinique médicale B.
THIEBLOT	Physiologie.
TRONCHE	Pharmacie chimique.
TURCHINI	Histologie et Embryologie.
VAURS	Bactériologie et Hygiène.
WILLEMIN-CLOG	Clinique médicale infantile.

II. Professeurs à titre personnel

MM. THOMAS	Oto-Rhino-Laryngologie.
VIALLET	Electro-Radiologie.

III. Professeurs sans chaire

MM. BERGER	Chimie analytique.
DUCHENE-MARULLAZ	Physiologie.
GERMAIN	Clinique chirurgicale B.

IV. Maîtres de Conférences agrégés

MM. ALFIERI	Biophysique médicale.
BOSSY	Anatomie.
Mlle CHATONIER	Chimie minérale et Minéralogie.
MM. CLUZEL	Bactériologie.
DELAGE	Anatomie pathologique.
M ^{mes} GAILLARD	Physique pharmaceutique.
MOINADE	Médecine générale et thérapeutique.
MM. PIGNIDE	Médecine générale.
VENRIES DE LAGUIL- LAUMIE	Anatomie pathologique.

V. Agrégés

MM. CHAMPEIX	Médecine légale et Médecine du travail.
FOURRIER	Orthopédie.
HOUDARD	Chirurgie générale.
JALLUT	Médecine générale.
JANNY	Neuro-Chirurgie.
MENUT	Pédiatrie et Puériculture.
MERCIER	Chirurgie générale.
Mlle RAMPON	Médecine générale.
MM. RENARD	Pneumo-phtisiologie.
TOURNILHAC	Neurologie et Psychiatrie.

Attaché principal : M. BERTHON

Bibliothécaire universitaire : M. ARCHIMBAUD

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentés à l'occasion d'une soutenance de thèse de doctorat en médecine ou en pharmacie doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation (Délibération en date du 6 juin 1956).

A MON PERE ET A MA MERE,

A MA FEMME ET A MES ENFANTS,

A MES BEAUX-PARENTS,

A MES FRERES,

A MA FAMILLE,

A TOUS MES AMIS,

Ce modeste travail est dédié.

A NOTRE MAITRE,

Monsieur le Professeur G. DASTUGUE,

Professeur de Biochimie Médicale
Pharmacien-Chef des Hôpitaux de Clermont-Ferrand
Docteur en Médecine et en Pharmacie
Docteur ès Sciences
Lauréat de l'Académie de Médecine et de l'Académie des Sciences
Chevalier de la Légion d'Honneur
Commandeur de la Santé Publique
Officier des Palmes Académiques

Dont l'érudition et l'esprit scientifique ont sans cesse orienté et suivi nos recherches après en avoir inspiré le thème avec Monsieur le Professeur BASTIDE.

Qui nous a fait l'honneur, après nous avoir dispensé ses leçons magistrales au cours de notre scolarité, de nous accueillir pendant plus d'un an dans son laboratoire, nous prodiguant son précieux enseignement et ses conseils les plus bienveillants.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude et le témoignage de notre reconnaissance.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE,

Monsieur le Professeur DASTUGUE,

Professeur de Biochimie Médicale

*Qu'il trouve ici l'expression respectueuse de nos
remerciements.*

A NOTRE JURY DE THESE,

Monsieur le Professeur BASTIDE,

Professeur de Chimie Biologique et de Pharmacodynamie
Pharmacien des Hôpitaux

Monsieur le Professeur TRONCHE,

Professeur de Pharmacie Chimique
Chevalier des Palmes Académiques

*Qui nous ont fait l'honneur de juger cette thèse,
En témoignage de gratitude et de profond respect.*

INTRODUCTION

Parler du développement de l'enzymologie clinique ou séméiologie enzymatique, est devenu un truisme. De plus en plus, la pratique médicale a recours au dosage des enzymes véhiculées par le torrent circulatoire ou inventoriées au niveau des organes : foie et muscles. Certes bien des questions restent encore en suspens, autant sur le plan pratique, le problème de l'expression des résultats, que sur le plan théorique, les subtilités de leur interprétation. Il n'en est pas moins vrai que la simplification des techniques, l'abondance des documents qu'elle entraîne, la valeur et la confrontation des résultats déjà obtenus, permettent d'ores et déjà de légitimer le concept d'*enzymopathologie*, substructure efficace dans la pratique médicale du diagnostic, du pronostic et du traitement d'affections les plus variées.

Le Professeur DASTUGUE et ses collaborateurs (50) ont pensé qu'il était possible et souhaitable d'esquisser en parallèle ce que pourrait être une *enzymopharmacologie*. Non pas tant l'étude pharmacologique des enzymes dans la mesure où celle-ci constituent des drogues à valeur officielle et inscrites aux différentes pharmacopées, mais surtout l'appréciation ou le dosage des activités enzymatiques d'une drogue dans la mesure où celles-ci peuvent témoigner de l'identité d'un produit biologique, de l'état de sa conservation, et parfois même, de son efficacité thérapeutique. A l'heure actuelle, où l'utilisation médicale se généralise de plus en plus, de cette forme pharmaceutique nouvelle que constituent les poudres lyophilisées de cellules, de tissus ou d'organes, un tel mode d'investigation pharmacologique paraît s'imposer sur une large échelle.

Sur les conseils de nos Maîtres, Messieurs les Professeurs DASTUGUE et BASTIDE, nous avons poursuivi dans cette voie, des sujets de recherches qui s'étaient déjà révélés si fructueux, en étudiant quelques activités enzymatiques de préparations spécialisées, destinées à l'administration par voie buccale.

Notre mémoire est divisé en trois parties principales. Au cours d'une première partie nous exposerons quelques généralités et nous présenterons les préparations étudiées, ainsi que la méthodologie selon laquelle nous avons mené l'étude des cinq activités enzymatiques suivantes : Amylolytique, Benzoyl-arginine-éthyl-estérasique, Caséinolytique, Cellulasique et Lipolytique.

La seconde partie sera constituée par la présentation des différentes méthodes utilisées pour l'appréciation de l'activité enzymatique citée, de la technique que nous avons retenue, ainsi que des résultats expérimentaux que nous avons obtenus.

L'interprétation de nos résultats et une discussion sur les différentes unités définissant l'activité enzymatique des préparations étudiées constituent la troisième partie, terminée par la conclusion générale.

Nous tenons à exprimer nos remerciements aux Laboratoires qui ont eu l'extrême obligeance de nous confier toutes les spécialités étudiées dans ce mémoire, et plus particulièrement ceux qui ont contribué très intensément à l'élaboration de ce travail en nous communiquant des documents scientifiques indispensables ou en nous aidant dans sa réalisation matérielle: Laboratoires BIOCOTEX (Assibiol*), ENDOPANCRINE (Cotazym*), GERDA (Pancrex*), LALEUF (Askenzyme*), LUCIEN (Hélicidine*), MARTIN (Eupepsa*), MARTINET (Chymalgyt*), MAUCHANT (Chymodrex*, Chymoral*, Chymocycline*), MERIEUX (Flaviastase*), NORGAN (Enzypan*), SOMEDIA (Festalé*), TORAUDE (Extranase*), VALPAN (Pancréanne Cellulase*), WANDER (Pantozyme*).

Nous ne saurions terminer cette introduction sans exprimer notre respectueuse gratitude à notre Maître, Monsieur le Professeur DASTUGUE, pour tous les conseils qu'il a bien voulu nous prodiguer tant à la Pharmacie du Centre Hospitalier et Universitaire, qu'au Laboratoire de Chimie Biologique et de Pharmacodynamie de la Faculté, ainsi qu'à Monsieur le Professeur BASTIDE dont les qualités et les profondes connaissances scientifiques nous ont été précieuses pour l'élaboration de ce travail.

Que Monsieur le Professeur TRONCHE soit assuré de notre profonde reconnaissance pour avoir bien voulu accepter de faire partie de notre jury de thèse.

Nous tenons particulièrement à exprimer notre vive reconnaissance et tous nos remerciements à notre Maître de stage, Monsieur le Docteur VILLARD, notre premier guide dans la profession pharmaceutique. Il nous a accueilli si amicalement dans son officine où, en compagnie de son assistant, Monsieur MANIGAULT, nous avons bénéficié d'une année dont nous garderons le meilleur souvenir.

Nos remerciements iront aussi à Monsieur ARCHIMBAUD, Bibliothécaire de l'Université, et à son personnel, qui ont toujours su faciliter nos recherches bibliographiques.

Que tous nos Maîtres de la Faculté de Médecine et de Pharmacie trouvent en ces lignes l'assurance de notre profonde reconnaissance pour la qualité de l'enseignement qu'ils nous ont prodigué.

Nous voudrions enfin adresser notre amical souvenir à l'égard de tous nos collègues du Laboratoire de Chimie Biologique et de Pharmacodynamie qui nous ont aidé dans ce travail, ainsi qu'à tous nos camarades d'Internat et de Faculté; il en est certains dont l'amitié ira bien au-delà de ces quelques années d'étude: Christian VALETTE, Michel MAYMAT, Pierre MERCURI, Philippe MARTIN.

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I

Généralités

L'acte de naissance des enzymes porte une date : 1833. Il mentionne aussi deux noms : Anselme Payen et Jean-François Persoz. C'est en effet à ces deux biochimistes français que revient le mérite d'avoir isolé la première enzyme et discerné ce que sont les caractères fondamentaux d'une enzyme. Ils avaient nommé leur substance « diastase ». Ce n'est que peu à peu que l'on préféra le nom d'enzyme, DELAUNAY (52).

De 1833 à 1850, cinq nouveaux corps étaient isolés : Pepsine, Emulsine, Myrosine, Trypsine et Lipase. A cette époque de leur découverte, l'analogie entre eux n'apparut pas.

En 1856, Pasteur abordait l'étude des fermentations pour affirmer quelques années plus tard qu'elles étaient des processus indissociables de la vie et qu'à chacune d'entre elles correspondait un organisme doué de propriétés biologiques spécifiques. Il avait démontré que des organismes vivants étaient leurs producteurs habituels.

En 1898, Buchner réussissait à extraire de la levure de bière la zymase.

La première étape de l'enzymologie fut celle de la découverte des ferments digestifs, la pepsine, la trypsine et les lipases, BICKEL (23). On en étudia les effets biochimiques et on précisa leur rôle de catalyseurs biologiques capables de présider à la destruction et aussi à la construction des substances organiques, bien avant d'en connaître la nature et la structure protidiques. On devait en effet observer par la suite, que les processus enzymatiques, loin de limiter leur action à la dégradation de divers produits de l'organisme, commandaient la plupart des réactions biochimiques qui se déroulent dans l'intimité des organes, plus particulièrement au niveau du foie, des reins, du cerveau, des glandes endocrines, du squelette et des muscles. On a appris que les enzymes étaient localisées non seulement dans l'ensemble de la masse protoplasmique cellulaire, mais aussi

dans les noyaux, les chromosomes et les mitochondries. Elles dirigent de ce fait, le jeu du métabolisme et des transformations d'énergie qui se déroulent au niveau cellulaire.

Dans une seconde phase, on a reconnu que le rôle des enzymes, primordial en physiologie normale, n'était pas moins important à l'état pathologique. Ainsi se sont créées entre autres, les notions de maladies par erreur, innée ou acquise, du métabolisme et de maladies moléculaires héréditaires, affection en relation évidente avec une disfonction ou une dysrégulation métabolique d'origine enzymatique.

La troisième étape, dont la médecine clinique recueille depuis quelques années le bénéfice grandissant, est celle de l'application du dosage des enzymes du sang au diagnostic de diverses maladies. Cette étude, inaugurée par la mise en évidence d'une augmentation de la phosphatasémie dans diverses maladies du squelette, de la prostate et du foie, a été récemment étendue au diagnostic de l'infarctus du myocarde et de certaines variétés d'ictère, ainsi qu'à un grand nombre de cas pathologiques, BASTIDE et DASTUGUE (18).

La quatrième phase, celle des applications thérapeutiques, est de beaucoup la plus récente, bien qu'on puisse lire dans les notes de Corvisart, médecin-chef des armées napoléoniennes, que l'administration de ferments digestifs était recommandable chez les sujets « dont les digestions sont paresseuses, imparfaites ou impossibles ». Cette application demeura pendant près d'un siècle la seule des indications de l'enzymothérapie. Ce développement tardif d'une médication qui suscite aujourd'hui de grands et légitimes espoirs, tient essentiellement au fait que la plupart des enzymes n'étaient obtenues qu'à un état de pureté imparfaite, ce qui compromettait l'emploi par voie parentérale (157).

Les traitements mettant en jeu des enzymes ne se bornent pas à la prescription de ferments à titre de remplacement ou en raison de certaines de leurs propriétés pharmaco-dynamiques. On sait que de nombreux médicaments naturels ou de synthèse sont actifs par l'intermédiaire d'un système enzymatique dont ils sont susceptibles de stimuler, d'inhiber ou de neutraliser l'action, DASTUGUE et BASTIDE (51).

Durant ces dernières années on a assisté à un développement des applications thérapeutiques des préparations enzymatiques, et il est à prévoir que ce nombre ira rapidement en grandissant, avec des applications cliniques très diverses, LAFILLE (99).

Les enzymes protéolytiques, en tant que facteurs protéolytiques purs, ont une utilisation généralement locale, en digérant des tissus nécrosés ou en fluidifiant diverses sécrétions. Dans ce domaine, la trypsine a suscité le plus d'intérêt. Elle permet au niveau des plaies la différenciation des tissus sains qui, protégés par leurs anti-enzymes, sont respectés, et des zones mortes qui sont lysées, liquéfiées. Ce caractère est également mis à profit dans la pose et le contrôle des greffes, et en chirurgie réparatrice, BARBIERI (16).

Les protéases constituent un groupe important. Elles règlent les réactions enzymatiques assurant la destruction par hydrolyse des molécules protidiques. Le terme final est représenté par la libération d'acides aminés. Les protéases synthétisées par les cellules peuvent, soit régler des réactions protéolytiques endo-cellulaires, soit être libérées dans le milieu extra-cellulaire, telles les protéases digestives excrétées dans la lumière gastro-intestinale, CLEMENT (36).

Les réactions protéolytiques obéissent aux règles classiques des réactions enzymatiques et n'interviennent en particulier qu'après union du substrat au centre actif de l'enzyme. La particularité la plus remarquable des enzymes protéolytiques réside dans le fait que la plupart d'entre elles ne présentent pas d'emblée un centre actif; elles existent en effet à l'état de précurseurs inactifs et ne sont définitivement constituées qu'après des phénomènes d'activation.

Depuis la constatation clinique de l'activité anti-inflammatoire de la trypsine purifiée administrée par voie intraveineuse, de nombreuses publications ont confirmé l'intérêt des enzymes protéolytiques en thérapeutique, tandis que le laboratoire en étudiait le mécanisme. Les voies parentérales d'administration obligeaient à utiliser un matériel enzymatique purifié en éliminant par conséquent la possibilité de l'étude de l'activité de complexes enzymatiques du type pancréatine. Il faut remarquer que l'effet thérapeutique des enzymes protéolytiques administrées par voie buccale, s'il a fait l'objet d'observations nombreuses, n'a été que rarement étudié par le laboratoire. Quelques auteurs ont présenté (23, 35) en 1961 une mise en évidence expérimentale de l'action anti-inflammatoire d'enzymes protéolytiques sur des œdèmes expérimentaux provoqués chez le Rat.

On peut imaginer que les effets protéolytiques se développent par l'un des mécanismes suivants :

- Destruction de résidus protéiques non spécifiques.
- Destruction de substances protéiques ayant une activité spécifique.
- Production, en partant de protéines, de fragments polypeptidiques doués d'une activité biologique spécifique.

MARTIN et BRENDÉL (111) ont également étudié un certain nombre d'enzymes protéolytiques agissant contre l'œdème provoqué chez le Rat par l'injection locale de blanc d'œuf, dans le but d'élucider le mécanisme de l'action anti-inflammatoire de ces enzymes.

SIMONNET et ses collaborateurs (167) ont constaté que l'inhibition de ce même œdème au blanc d'œuf, conférée après administration intrapéritonéale d'enzyme, est proportionnelle aux doses d'enzyme utilisées. Par voie buccale, l'inhibition est à la limite de la signification lors de l'utilisation d'enzyme protégée. Sur l'œdème généralisé au Dextran, l'action anti-inflammatoire est très importante, par voie buccale aussi bien que par voie péritonéale, l'inhibition est proportionnelle aux doses administrées, COHEN (37).

Enfin les mêmes auteurs, contrairement à MARTIN et coll. (109) ont remarqué que l'activité anti-inflammatoire ne semble pas être en relation avec l'activité enzymatique exprimée en unités protéolytiques. De plus, ils constatent que l'action anti-inflammatoire des enzymes protéolytiques n'est pas spécifique de telle ou telle enzyme.

Plusieurs enzymes protéolytiques ont été utilisées en thérapeutique au cours de ces dernières années, mais ce sont la trypsine pancréatique et l'alphachymotrypsine qui ont reçu les applications les plus nombreuses comme agents anti-inflammatoires et anti-œdèmes. On les retrouve notamment dans Alphintern* et Tryscapine*.

Même en se cantonnant par exemple, à l'éventail des préparations spécialisées, à base d'enzymes, uniquement destinées à l'administration par voie buccale, qui est proposé au choix du praticien, on ne relève pas moins de quarante produits. En effet le rôle des enzymes digestives, bien connu depuis longtemps, est de plus en plus utilisé en thérapeutique. L'action protéolytique, fibrinolytique, mucolytique de quelques autres s'accompagne d'un pouvoir anti-inflammatoire et légitime leur emploi dans certaines affections.

Certaines enzymes sont ingérées dans un but substitutif dans diverses insuffisances afin d'améliorer ce trouble fonctionnel digestif. Pour agir avec un maximum d'efficacité, une thérapeutique suppléant les déficiences digestives doit encore exercer son activité diastasique sans subir d'altération au cours du transit. Elle doit encore tenir compte du fait qu'une carence en une seule enzyme réagit sur l'ensemble des phénomènes digestifs, imposant le plus souvent une thérapeutique polyenzymatique. Toutefois, la seule notion d'insuffisance digestive organique ou fonctionnelle n'explique pas toutes les anomalies de la digestion.

D'une part, une digestion insuffisante des protéines animales ou végétales au niveau du grêle déplace l'équilibre de la flore intestinale dans un sens défavorable. La persistance de polypeptides à chaîne longue, favorise la pullulation de germes putréfiants; la présence de peptides à chaîne courte, se présente comme des facteurs de croissance pour la flore lactique, favorable à une digestion convenable.

D'autre part, la déficience quantitative des enzymes d'origine pancréatique est à la source des troubles du transit, d'une excrétion anormale par la muqueuse intestinale de protéines ou de lipides d'origine endogène, aggravant ainsi les carences par troubles de l'absorption.

En tenant compte de ces données, il importe que les extraits enzymatiques substitutifs aient une activité titree et constante et qu'ils soient apportés sans altération au lieu même de leur action.

Dans ce groupe peuvent prendre place : Aerocid*, Amylodiastase*, Chlorhydropeptine*, Chloripepsine*, Depancof*, Digestobiase*, Enzylac*, Eupeptique Tizy*, Gastropyloré*, Higalex*, Muripsine*, Pancrèbile*, Pancrédiasse*, Pancrépar*, Pancrépeptal*, Pepsinacid*, Prandilex*, Tridigestine*.

Volontairement, nous n'avons pas cité précédemment certains produits qui font plus particulièrement l'objet de notre étude.

Dans le groupe des médicaments substitutifs du système digestif seront étudiées chacune de ces spécialités dont la composition donnée est la suivante : ASKENZYME dragée.

Extrait de culture de souches sélectionnées d' <i>Aspergillus Aureus</i> adaptées par mutation en vue de l'élaboration d'enzymes	0,15 g
Excipient q.s.p. une dragée	0,45 g

ASSIBIOL comprimé.

Comprimé rose :

Pepsine	0,05 g
---------------	--------

Levure lyophilisée	0,05	g
Excipient q.s.p. un comprimé	0,45	g

Comprimé bleu :

Diastase de l'orge germé	0,05	g
Pancréatine	0,05	g
Papaïne	0,10	g
Excipient q.s.p. un comprimé	0,50	g

COTAZYM comprimé.

Poudre de pancréas	0,170	g
Extrait de bile desséché	0,065	g
Cellulase	0,010	g
Bicarbonate	0,195	g
Excipient q.s.p. un comprimé	0,600	g

ENZYPAN comprimé.

Pepsine	0,004	g
Pancréatine	0,092	g
Bile	0,056	g
Excipient q.s.p. un comprimé	0,40	g

EUPEPSA granulé.

T. Fèves de Calabar	1,20	g
T. Jusquiame	0,80	g
Pepsine	2	g
Pancréatine	2	g
Diastase	2	g
Papaïne	1	g
Sucre aromatisé q.s.p. granulé	100	g

FESTALE dragée.

Ferments pancréatiques	0,192	g
Hémicellulase	0,050	g
Bile de bœuf	0,025	g
Chlorure de sodium	0,100	g
Excipient q.s.p. une dragée	0,65	g

FLAVIASTASE comprimé.

Unités dextrinantes	2,500	
» saccharifiantes	1,000	
» caséinolytiques	2,500	
» gélatinolytiques	100	
Excipient q.s.p. un comprimé	0,34	g

PANCREANNE CELLULASE dragée adultes.

Pancréas pulvérisé	0,05	g
Pancréatine	0,10	g
Tanin	0,02	g
Cellulase	0,10	g
Excipient q.s.p. une dragée	0,60	g

PANCREANNE CELLULASE poudre enfants.

Pancréas pulvérisé	0,025	g
Pancréatine	0,050	g

Tanin	0,010 g
Cellulase	0,050 g
Excipient q.s.p. une mesure	0,30 g

PANTOZYME dragée.

Pepsine	0,10 g
Pancréatine	0,10 g
Amylase	0,07 g
Cellulase	0,07 g
Protéase	0,07 g
Acide cholique	0,001 g
Excipient q.s.p. une dragée	0,90 g

PANCREX dragée.

Pancréatine	0,20 g
Excipient q.s.p. une dragée	0,57 g

Dans le second groupe de médicaments facteurs protéolytiques, utilisés comme lytiques ou comme fluidifiant, on peut citer les spécialités dont la composition donnée est la suivante :

EXTRANASE dragée.

Bromélaïnes. Unités Rorer	50.000
Excipient q.s.p. une dragée	0,20 g

HELICIDINE sirop.

Hélicidine. Unités Hélicidine	500
Excipient q.s.p. sirop aromatisé	125 ml
Paraoxybenzoate méthyl	0,12 g

Enfin dans le groupe des produits anti-inflammatoires prennent place les spécialités dont la composition donnée est la suivante :

CHYMALGYL comprimé.

Enzymes protéolytiques. Unités Armour	50.000
Acide acétyl salicylique	0,30 g
Excipient q.s.p. un comprimé	0,46 g

CHYMOCYCLINE dragée.

Enzymes protéolytiques. Unités Armour	50.000
Tétracycline	0,250 g
Excipient q.s.p. une dragée	0,80 g

CHYMODREX dragée.

Enzymes protéolytiques. Unités Armour	50.000
Téclothiazide	0,018 g
Excipient q.s.p.	0,40 g

CHYMORAL dragée.

Enzymes protéolytiques. Unités Armour	50.000
Excipient q.s.p. une dragée	0,40 g

Au cours de ce travail, nous étudierons et comparerons les cinq activités enzymatiques suivantes: amylolytique, caséinolytique, benzoyl-arginine-éthyl-estérasiq, cellulasiq et lipolytique, chez ces préparations citées précédemment et destinées à l'administration par voie buccale.

CHAPITRE II

Méthodologie

Les formes pharmaceutiques considérées sur lesquelles sont effectués les différents essais, sont au nombre de quatre : dragée, comprimé, granulé et sirop. Les trois premières formes se prêteront, quelquefois assez facilement, à une séparation, aussi élémentaire soit-elle, des principes actifs.

La dragée doit être débarrassée de son excipient et de l'enrobage afin d'obtenir le principe actif destiné au dosage sans éléments susceptibles de modifier le résultat. On tient compte cependant de l'état physique de l'échantillon : poids moyen, humidité, couleur (138). L'un des moyens les plus pratiques pour éliminer l'enrobage de la dragée, est de la laver sous un mince filet d'eau en la brossant légèrement avec une brosse douce. Le lavage est arrêté dès l'apparition de l'enveloppe qui protège le noyau central de principes actifs. Celle-ci est alors séchée avec du papier filtre ou un linge fin ; c'est cette partie centrale de la dragée qui est finement pulvérisée et qui constitue la prise d'essais.

Quelquefois, mais très rarement, l'enveloppe se sépare d'elle-même, par effet d'une simple pression exercée sur la dragée.

Le cas des comprimés et des granulés est moins simple. Les uns et les autres sont formés d'une seule partie constituée par une poudre homogène de plusieurs constituants. Il est impossible dans ce cas de séparer excipients et principes actifs. On tient compte cependant de l'état physique de l'échantillon. Le comprimé est écrasé et pulvérisé au mortier. La poudre obtenue constitue la prise d'essais à doser.

Quant aux granulés, on prend un poids p correspondant à une dose thérapeutique. On pulvérise également au mortier pour obtenir la poudre qui fera l'objet de l'essai.

Il en est de même en ce qui concerne le sirop : il ne saurait être question de séparer principes actifs et excipients. Pour ces trois formes galéniques donc, on laisse décanter la solution enzymatique afin de travailler sur un liquide aussi limpide que possible.

La solution enzymatique mère est constituée par la mise en solution dans 100 ml d'eau distillée, de la poudre obtenue à partir d'une dragée, d'un comprimé, ou d'une dose thérapeutique de granulé. En prenant comme unité, une dragée, un comprimé, une dose de granulé ou de sirop, on peut dire conventionnellement que la solution obtenue est au centième. A partir de celle-ci on prépare une série de quatre dilutions qui feront l'objet des essais.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de substrat métabolisé en un temps donné pour des dilutions données. Chaque tube de la gamme étalon, du plus clair au plus foncé pour les mesures des pouvoirs amylolytique et benzoyl-éthyl arginine-estérasique, et du plus foncé au plus clair pour les mesures des pouvoirs caséinolytique, cellulasique et lipolytique, correspondent respectivement à 100, 90, 80... et 0 pour cent d'hydrolyse.

Les préparations considérées, n'étant pas des enzymes cristallisées, hautement purifiées, on ne peut comparer des résultats obtenus qu'avec la même dilution et le même temps d'incubation, puisque les activités ne sont pas rigoureusement proportionnelles à la dilution et au temps d'incubation.

Afin de rapporter chaque préparation à une valeur de base plus facilement comparable avec celle de sa voisine, nous avons effectué sur chacune d'elles un dosage de protéines au moyen d'un dosage de l'azote total de l'échantillon. Ce dosage a été effectué par la micro-méthode de Kjeldahl. La prise d'essais est obtenue de façon identique à celle destinée aux dosages enzymatiques. Les résultats sont exprimés en grammes d'azote total pour cent grammes de produit actif, en excluant excipient et enrobage, et par conséquent en grammes de protéines pour cent grammes de produit actif. Quelques exceptions nous obligeront à exprimer les résultats en pourcentage de protéines par quantité de comprimé ou de sirop.

La lecture des résultats chiffrés de ce travail aurait pu conduire un esprit soucieux d'établir un certain classement dans l'activité thérapeutique des diverses préparations présentées, à reconnaître une hiérarchie dans celles-ci.

Là n'étant pas le but de notre étude, il nous a paru indispensable d'entourer nos tableaux récapitulatifs de résultats, d'un anonymat qui évitera de la sorte un jugement discutable.

Nous avons pensé que néanmoins, chaque Laboratoire Fabricant devait connaître l'étude concernant son propre produit, et c'est ainsi que de fructueux échanges de point de vue ont été engagés. Celui-ci saura reconnaître les résultats concernant sa spécialité parmi les autres et pourra ainsi, personnellement, s'il le désire, situer sa production au milieu de l'éventail présenté.

Au cours de ce travail les préparations étudiées seront retrouvées sous les sigles suivants : Askenzyme* A, Assibiol* B, Chymalgyl* C, Chymocycline* D, Chymodrex* E, Chymoral* F, Cotazym* G, Enzypan* H, Eupepsa* J, Extranase* K, Festale* L, Flaviastase* M, Pancréanne Cellulase* adulte et enfant Na et Ne, Helicidine* P, Pantozyme* Q. Pancrex* R.

N.B. Les mesures ont été effectuées avec un photocolorimètre Medico-Kolorimeter. Standardmodell. D. R. B. Lange. Berlin.

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE I

Pouvoir Amylytique

L'activité amylytique des produits étudiés est due à la présence dans chacun d'eux, d'extraits pancréatiques, en plus ou moins grande quantité. Le suc pancréatique en effet contient en solution une dizaine d'enzymes extrêmement actives. Parmi les plus importantes se trouvent l'amylase, la lipase, les protéases.

Le fait très anciennement connu, cité par POLONOVSKI (142), de la dégradation de l'amidon par les diastases du malt, a pu être étudié avec plus de précision grâce à la séparation plus parfaite de l'amidon en amylose et amylopectine, et à la préparation d'enzymes purifiées.

L'hydrolyse enzymatique par les différentes amylases révèle des divergences entre les α -amyloses et les iso-amyloses : la vitesse augmente avec la progression de l'hydrolyse pour les premières, tandis qu'elle diminue pour les secondes. D'autre part on parvient aisément à une hydrolyse totale des α -amyloses, alors que les iso-amyloses conduisent à des dextrines résiduelles. Ce comportement est dû à l'existence, au niveau des ramifications, de liaisons glucosidiques 1-6, qui résistent à l'action des amylases :

— Les α -amylases, inactivées par les acides à température ordinaire, que l'on trouve dans les sécrétions digestives animales, scindent les liaisons glucosidiques 1-4 en s'attaquant aussi bien aux chaînes internes qu'aux chaînes externes, et découpent l'amidon en maltose, glucose et α -oligodextrines limites ramifiées

— Les β -amylases, inactivées à 70 °C mais résistantes aux acides; amylases végétales, n'hydrolysent que les liaisons 1-4 pénultièmes des chaînes externes

en formant du maltose, et en laissant une β -dextrine limite n'ayant plus que des chaînes externes de deux ou trois résidus de glucose.

Les deux types d'amylase ont d'autre part un mécanisme d'action différent par le maltose formé a une structure d' α -maltose dans le cas de l' α -amylase, alors qu'il apparaît sous forme β lors de l'hydrolyse par la β -amylase, MYRBACK (118).

Au cours de notre étude, le pouvoir amylolytique mesuré, est donc celui de l'amylase pancréatique. Comme l'amylase salivaire, c'est une α -amylase ou endo-amylase, capable de rompre à l'intérieur de la chaîne la liaison 1-4 α -glucosidique de l'amidon ou du glycogène. Par cette action ces polysaccharides sont rapidement hydrolysés en maltose, disaccharide réducteur.

La détermination de l'activité de l' α -amylase est assez aisée et peut être réalisée par de nombreuses méthodes; NIELSEN (125) en a relevé 150, citées par Wildner. De plus beaucoup de chercheurs apportent leurs propres modifications. Cependant la plupart des méthodes utilisées sont basées sur l'un des principes suivants :

— La mesure de la baisse de la viscosité des liquides pendant l'hydrolyse enzymatique de l'amidon;

— L'observation de l'activité amyloclastique et dextrinante, c'est-à-dire du changement de coloration avec l'iode;

— La mesure de l'action saccharifiante, c'est-à-dire de la quantité de substances réductrices apparues.

I) Variation de viscosité.

L'action amylasique est caractérisée par une chute rapide de la viscosité de la pâte d'amidon; cette diminution convenablement mesurée, peut être utilisée comme une mesure de l'activité enzymatique. Les méthodes viscosimétriques ont l'avantage de mettre en évidence l'activité amylasique même à des degrés extrêmement faibles d'hydrolyse. MYRBACK et GJORLING ont montré (117) au cours d'une expérience sur l'amylase de malt que lorsque la viscosité d'une pâte d'amidon avait baissé de moitié, le nombre initial des chaînes glucosidiques avait diminué de 0,1 pour cent. Une technique semblable a été proposée par BLOM (25).

On ne peut nier toutefois que ces méthodes présentent de sérieux désavantages. Les résultats sont étroitement tributaires de la préparation de la solution de substrat, et leur reproductibilité est loin d'être satisfaisante. Les techniques basées sur ce principe sont abandonnées actuellement.

II) Changement de coloration avec l'iode.

C'est la méthode décrite par WOHLGEMUTH (185). Il existe de nombreuses modifications. Les mesures sont faites dans les conditions précises du temps nécessaire au changement de coloration ou de la quantité d'enzyme nécessaire à produire le changement dans un temps donné. Dans certaines conditions les expériences montrent que l'activité est proportionnelle à la quantité d'enzyme

utilisée. On détermine l'activité amylasique par dosage, soit de l'amidon qui reste, soit du sucre réducteur formé.

Parmi les méthodes basées sur le dosage de l'amidon restant, nous pouvons citer les techniques rassemblées par METAIS (116) et proposées par HUGGINS et RUSSEL (85), ZINKER et REITHEL (186), SMITH et ROE (168), VINCENT et SE-GONZAC (178), VAN LOON et Coll. (105), enfin RICHTERICH (146). Utilisée surtout par les auteurs anglo-saxons, cette méthode est facile à mettre en œuvre et fournit des résultats reproductibles à condition d'opérer toujours avec des préparations d'amidon identiques, HANES (81), MAES (107).

III) Pouvoir saccharifiant.

Dans les méthodes basées sur le dosage du sucre réducteur formé, nous citons les techniques rassemblées par BISERTE et ROUSSEL (24) et proposées par SOMOGYI (170), qui caractérise le pouvoir réducteur par un réactif arsénio-molybdique, par PAGET et DELAISSE (129) qui utilisent des sels mercuriques, et par PENARANDA (131) qui emploie le réactif de FOLIN et WU (71). KIBRICK et Coll. (94), ainsi que SOBEL et MYERS (169) préconisent une méthode basée sur le même principe.

Les méthodes basées soit sur le dosage de l'amidon restant, soit sur celui du sucre réducteur formé, diffèrent par la quantité d'enzyme utilisée, le temps d'incubation, le mode de calcul des résultats, l'emploi d'un tampon et par la température. Les résultats ne peuvent donc être facilement comparés.

Mais selon Nielsen (125), la valeur des méthodes à l'iode paraît diminuée par le manque de connaissance sur la relation entre la couleur et la nature de la dégradation des produits.

Technique utilisée.

La technique que nous avons retenue est celle de WOHLGEMUTH (185).

— *Principe.* L'amidon soluble restant après incubation enzymatique est coloré par l'iode et dosé au colorimètre. Les dextrines formées dans la réaction ne donnent pas de coloration avec l'iode.

— *Réactifs.* 1° Substrat : un g d'amidon soluble Merck n° 1257 est délayé dans trois ml d'eau distillée froide. On ajoute alors en une fois 95 ml d'eau distillée bouillante en agitant. Porter deux minutes à faible ébullition. Retroidir rapidement sous un courant d'eau. Ajuster à 100 ml.

2° Tampon : $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ à 13,6 g par litre 89 ml
 PO_4HNa_2 , $12\text{H}_2\text{O}$ à 35,8 g par litre 11 ml

Ajuster à pH 6.

3° Solution iodo-iodurée : Solution mère : Iode un g + IK deux g dans 3 ml d'eau distillée. Dissoudre. Ajouter à 100 ml. La solution diluée prête à l'emploi est préparée avec 1 ml de solution mère et 24 ml d'eau distillée.

— *Technique.* Dans un tube à hémolyse on introduit :

— Solution d'amidon	1	ml
— Tampon	1	ml
— Enzyme	1	ml

Mettre au bain-marie à 37 °C trente minutes exactement. En fin d'incubation ajouter 1 ml d'acide trichloracétique à 10 pour cent. Agiter.

Dans un tube jaugé à 25 ml on introduit :

— Incubat	1,33 ml
— Eau	15 ml
— Iode diluée	1 ml
— Eau distillée q.s.p.	25 ml

Agiter. Repos cinq minutes. Lire à 600 m μ .

— *Gamme étalon.* Prendre une série de tubes à hémolyse et introduire successivement : 0 - 0,1 - 0,2... 1 ml de solution d'amidon, 1 ml de tampon et compléter à 3 ml avec de l'eau distillée. Agiter. Prendre 1 ml du mélange dans un tube jaugé à 25 ml et opérer comme précédemment.

N.B. a) Les temps d'incubation seront de quinze, trente minutes, une et deux heures afin d'étudier l'influence de l'incubation.

b) La solution enzymatique est étudiée simultanément selon plusieurs dilutions.

L'activité amylolytique a été successivement étudiée sur les six préparations suivantes :

- Pancrex*
- Pancréenne Cellulase* adulte
- Eupepsa*
- Enzypan*
- Cotazvm*
- Askenzyme*

Les résultats donnés en pourcentage de substrat hydrolysé dans les temps retenus, sont groupés dans le tableau I. Les chiffres présentés sont la moyenne de cinq essais.

Il nous faut préciser que la technique de Wohlgemuth, si elle est excellente pour les α amylases comme celles de la salive et du pancréas, est moins précise pour étudier l'amylase des Aspergillacées, active en milieu acide et de mode d'action différent. Il est donc normal que les préparations à base d'extraits d'Aspergillacées donnent des résultats plus faibles par cette méthode.

Nous avons observé que la majorité des préparations étudiées présentent une activité pour des dilutions allant du 1/12 500 au 1/50 000, avec des variations normales correspondant à la nature de chaque produit.

Des temps d'incubation de trente et soixante minutes nous semblent suffisants pour étudier les possibilités d'activité enzymatique d'un échantillon.

Ces chiffres montrent enfin qu'il est pratiquement impossible d'établir une proportionnalité constante dans la progression de l'activité entre les dilutions d'une part, et entre les différents temps d'incubation d'autre part.

Pour une dilution au 1/50 000, et pour un temps d'incubation de trente minutes, on peut citer le plus fort pourcentage de substrat hydrolysé : 33 pour cent, et le plus faible : 5 pour cent.

En conclusion, il apparaît que l'activité amylolytique mesurée est relativement élevée et rapidement mise en évidence.

TABLEAU I. — POUVOIR AMYLOLYTIQUE

Dilutions :	1/2 500	1/5 000	1/10 000	1/12 500	1/16 500	1/25 000	1/33 000	1/50 000	1/100 000	Incubation
A G H J Na R				14 14	16 30 10 12	4 12 26 8 0	0 8 22	5 18 3		15 mn
A G H J Na R	40	21	13	33 25	37 62 20 25	20 30 52 17 14	25 21 45	7 5 33 14	3 5 8	30 mn
A G H J Na R	50	30	15	40 30	60 91 33 20	43 50 75 20 10	29 30 55	13 19 47	2 5 14	1 h
A G H J Na R	75	42	23	53 58	80 96 42 60	43 62 86 37 22	32	17 20 67	3	2 h

POURCENTAGE DE SUBSTRAT HYDROLYSE EN CONSIDERANT LE TEMPS D'INCUBATION ET LA DILUTION

CHAPITRE II

Pouvoir benzoyl arginine ethyl estérasique

Le suc pancréatique contient plusieurs enzymes protéolytiques dont trois au moins sont sécrétées sous forme de précurseurs inactifs : trypsinogène-trypsine, chymotrypsinogène-chymotrypsine, et procarboxypeptidase-carboxypeptidase. Toutes ces enzymes collaborent à l'hydrolyse complète des protéines alimentaires jusqu'au stade terminal d'amino-acides, DE MOERLOOSE (55).

Les activités trypsique et chymotrypsique diffèrent par leur spécificité. La trypsinase rompt les liaisons peptidiques au niveau du carboxyle de la lysine ou de l'arginine. La chymotrypsine intervient sur les liaisons peptidiques qui englobent le carboxyle de la tyrosine ou de la phényl-alanine. Cette spécificité a été étudiée par SCHWERT et Coll. (162) pour mettre au point des techniques de détermination de ces enzymes.

De nombreuses méthodes de dosage de l'activité enzymatique des protéases ont été décrites par BRUSTIER (30) notamment. Les méthodes les plus générales sont basées sur l'estimation de la libération de groupes aminés ou carboxyles de lysine ou d'arginine (78, 86, 123). Les mesures sont effectuées par la technique de VAN SLYKE (177), par des techniques de titration des groupes carboxyles par la potasse alcoolique (76), ou de groupements aminés par l'acide chlorhydrique dans l'acétone (105), et la technique colorimétrique à la ninhydrine (161).

Il est possible de distinguer deux groupes dans ces méthodes :

A. Les méthodes utilisant un substrat naturel.

Ce sont les méthodes les plus anciennes; elles mettent en œuvre des protéines naturelles comme :

1) La caséine (97), hydrolysée en libérant de la tyrosine et du tryptophane qui peuvent être déterminés au photocolorimètre. La méthode de NORTHROP (126) diffère de la précédente par le dosage par la formol-titration des acides aminés libérés. Ce substrat a encore été utilisé par GROB (77) et BERGKVIST (22).

2) L'hémoglobine, utilisée par d'ANSON (5, 7, 8), et WERLE (179). Elle donne après hydrolyse tyrosine et tryptophane que l'on détermine par la méthode de FOLIN et CIOCALTEU (70).

3) La gélatine et le lait, utilisés par KUNITZ (95), WILLSTAETTER (183), NORTHROP et KUNITZ (127).

4) La fibrine, utilisée par ASTRUP (10) et retenue par la Pharmacopée française dans sa VII^e édition (135).

5) La serumalbumine, étudiée par KAMINSKI-TANNER (92).

B. Les méthodes utilisant un substrat synthétique.

Ce sont les méthodes modernes utilisant des substrats de bas poids moléculaire et spécifique de l'enzyme à doser. Il faut envisager ces méthodes selon la technique de mesure :

a) Titrimétrie. La détermination de la trypsine est basée sur l'usage de l'amide de la benzoyl tyrosyl glycine pour KUNITZ (96), du N benzoyl arginine amide et le dosage de l'ammoniaque libéré pour NARDI (121), du N benzoyl arginine éthyl ester et titration de la fonction acide libérée pour SCHWERT (160).

b) Manométrie. Dans la méthode de PARKS (130), le substrat utilisé est le chlorhydrate de l'ester éthylique de la phénylalanine. Son hydrolyse donne du gaz carbonique mesuré à l'appareil de Warburg. KUNITZ (98) utilise l'amide de la carbobenzoxyglycyl tyrosylglycine.

c) Potentiométrie. La méthode potentiométrique a été proposée par SCHWERT (164), puis par BALLS et JANSEN (14), ainsi que par ISELIN (87). On titre de façon continue les groupes carboxyles libérés à partir du substrat. Les substrats utilisés sont nombreux :

— Ester éthylique de la N acétyl tyrosine (39).

— Ester éthylique de la phénylalanine (39).

— Benzoylarginine naphtylamide (76, 147).

FIGARELLA et Coll. (68) ont présenté la mise au point des techniques de dosage potentiométrique de la chymotrypsine et de la trypsine du suc duodéal humain, par leur action sur leurs substrats spécifiques respectifs : acétyl-L-tyrosine-éthyl ester (ATEE) et benzoyl-L-arginine-éthyl ester (BAEE). La définition des unités enzymatiques utilisées est celle adoptée par la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie (145) d'après laquelle une unité enzymatique est la quantité d'enzyme qui, dans des conditions bien précises, décompose un micro-équivalent de substrat ou engendre un micro-équivalent de produit par minute.

d) Spectrophotométrie. Dans ces méthodes on dose directement les produits de dégradation provenant de l'hydrolyse du substrat. On peut citer la méthode de MARTIN (110) utilisant comme substrat l'ester du N carboxytyrosine nitrophénol. SCHWERT (161) a proposé aussi une série d'esters de la tyrosine. HUMMEL (86) a préparé d'autres esters de la tyrosine, l'ester éthylique de la N benzoyl tyrosine notamment. SCHWERT et TAKENAKA (163), BASTIDE (19) emploient le N benzoyl arginine éthyl ester et la détermination spectrophotométrique dans l'ultra-violet. En utilisant le BAEE qui réagit sur les liaisons peptidiques, combinées en position à un groupement basique d'arginine ou de lysine, on met spécifiquement en valeur l'action hydrolysante de la trypsine. C'est à cette technique que se rapporte la Pharmacopée française dans sa VIII^e édition (137).

TABLEAU II. — POUVOIR B.A.E. ESTERAS

Dilutions :	1/125	1/165	1/250	1/500	1/1 250	1/1 650	1/2 500	1/5 000	1/6 000	1/8 000	1/12 000
B	23	19	10	7							1
C											
G											
J											
K	53	50	50	45					46	45	4
M					43	43	40	39	56	44	2
R											
B	33	24	15	6							2
C											3
G											4
J											
K	51	50	50	48					47	47	5
M					55	52	47	42	76	67	
R											
B											40
C											43
G											
J											
K	50	52	48	45					49	47	
M					63	54	50	46			
R											
B	52	52	30	18							47
C											42
G											43
J											
K	70	52	43	43					47	45	
M					70	65	55	50	92	86	73
R											
B											44
C											47
G											
J											
K	50	50	45	45					50	48	
M					73	68	58	52			
R											

POURCENTAGE DE SUBSTRAT HYDROLYSE EN CONSIDERANT LE TEMP

Enfin certains auteurs emploient la N benzoyl arginine β naphtylamide et dosent la naphtylamine libérée par une méthode colorimétrique, tels SELIGMAN et Coll. (165), SCHON et RASSLER (158), ou par fluorimétrie tel ROTH (151).

Il faut signaler aussi la méthode originale de LAPORTE (100) : le substrat est un film de gélatine.

Technique utilisée.

La technique que nous avons utilisée est celle de BROWN (29).

Principe. — Ce substrat restant en fin d'incubation réagit en milieu alcalin sur le mélange hydroxylamine + soude, puis en milieu acide sur le chlorure ferrique pour donner un complexe coloré se prêtant à une estimation colorimétrique à 540 m μ .

Réactifs. — 1) Substrat : Chlorhydrate d' α benzoyl arginine éthyl ester. On dissout 0,3428 g dans 50 ml d'eau distillée. Cette solution ne doit être conservée que quelques heures à + 4°C. Elle est stable à pH 3,6 mais peut s'hydrolyser à pH alcalin.

2) Tampon barbital : A 66,2 ml d'une solution de barbital sodique à 10,30 g et q.s.p. 500 ml d'eau distillée, on ajoute 33,8 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 0,10 N. Le pH du tampon est de 7,8.

3) Hydroxylamine neutralisée. Une solution aqueuse de chlorhydrate d'hydroxylamine à 13,9 pour cent est à peu près neutralisée par un égal volume de soude à 14 pour cent. Cette solution doit se préparer extemporanément car elle ne se conserve pas plus de trois heures. La solution mère d'hydroxylamine est conservée à + 4°C.

4) Acide chlorhydrique 3 N. Un volume d'HCl concentré est dilué par trois volumes d'eau distillée (HCl 2,5 N).

5) Chlorure ferrique à 10 pour cent. Cette solution est préparée dans HCl; 10,10 N, soit 21,4 ml de solution de perchlorure de fer Proiabo et q.s.p. 100 ml d'HCl, 0,10 N.

6) Acide trichloracétique à 10 pour cent en solution aqueuse.

7) Soude à 14 pour cent.

Gamme étalon. — Prendre onze tubes à hémolyse numérotés de 0 à 10. Introduire dans chacun 0 - 0,1 - 0,2 - 0,3 ... 1 ml de substrat. Compléter à 1 ml avec de l'eau distillée tous les tubes. Ajouter dans tous les tubes 1,5 ml de tampon barbital et 1,5 ml d'acide trichloracétique.

Après agitation, prélever dans une série de onze tubes à essais 2 ml et ajouter dans tous les tubes 2 ml d'hydroxylamine neutralisée. Agiter. Repos trois minutes.

Ajouter enfin dans tous les tubes 1 ml d'acide chlorhydrique 3 N et 2 ml de chlorure ferrique à 10 pour cent. Agiter. Repos 15 minutes. Lire au photolorimètre à 540 m μ .

Ces tubes correspondent à 100 - 90 - 80... et 0 pour cent d'hydrolyse du substrat par la solution enzymatique.

Technique. — Prélever dans deux tubes à hémolyse A et B, 1 ml de substrat et 1 ml de tampon barbital. Ajouter au tube A 0,50 ml de solution enzymatique. Mélanger. Mettre à incuber le temps nécessaire.

Après incubation, sortir les tubes. Ajouter 1,5 ml d'acide trichloracétique à 10 pour cent. Introduire dans le tube B 0,50 ml de solution enzymatique. Les tubes sont bien agités. Repos cinq minutes. Centrifuger dix minutes à 2 500 t.

Dans un tube à essais prélever 2 ml de centrifugat. Joindre un second tube contenant 2 ml d'eau distillée pour faire le zéro. Dans tous les tubes ajouter 2 ml d'hydroxylamine neutralisée. Agiter. Repos trois minutes. Ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique 3 N. Agiter. Ajouter 2 ml de chlorure ferrique à 10 pour cent. Agiter. Repos quinze minutes. Lecture à 540 mμ.

Le tube B correspond à 0 pour cent d'hydrolyse.

N.B. — Les temps d'incubation seront de une, deux, trois, quatre et six heures.

Le pouvoir protéolytique mesuré par l'activité benzoyl-arginine-éthyl-estérase, a été étudié sur les sept préparations suivantes :

- Assibiol*
- Chymalgyl*
- Cotazym*
- Eupepsa*
- Extranase*
- Flaviastase*
- Pancrex*

Les résultats sont rassemblés dans le tableau II; ils sont constitués par la moyenne de cinq essais.

La majorité des préparations étudiées présentent une activité pour des dilutions allant du 1/5 000 au 1/25 000, avec des variations normales correspondant à la nature de chaque produit.

Les temps d'incubation les plus prolongés ne semblent pas donner des résultats intéressants. Des comparaisons entre une heure et deux heures semblent être suffisantes. On observe qu'il n'y a aucune progression dans l'activité proportionnelle à la dilution ou au temps d'incubation.

Pour une dilution au 1/25 000 et pour un temps d'incubation de une heure, on peut citer le plus fort pourcentage de substrat hydrolysé : 43 pour cent, et le plus faible : 5 pour cent.

En conclusion, il apparaît que l'activité B.A.E.Estérase est considérable dans les préparations étudiées et qu'elle est rapidement mise en évidence.



CHAPITRE III

Pouvoir Caséinolytique

Le pouvoir caséinolytique a été mesuré par une méthode tirée de celle de D'ANSON (6) et de KUNITZ (98).

— *Principe.* Le substrat protéique est une solution de caséine. Après hydrolyse enzymatique, l'excès de caséine est éliminé par l'acide trichloracétique. Le surnageant donne avec le réactif de Folin Ciocalteu une coloration bleue due aux produits d'hydrolyse que l'on peut mesurer au photocolorimètre à 650 m μ . L'étude est quantitative et ne peut servir à une caractérisation car elle est non spécifique.

— *Réactifs.* 1) Caséine lactique (Hammarstein. Merck 2242). Un g de caséine est mis en solution dans 100 ml de tampon phosphate à pH 7,7 avec un agitateur magnétique qui évite le grumelage. Puis on porte au bain-marie bouillant pendant 10 minutes. Après refroidissement on peut soit couler en tubes, soit conserver en ballon. Cette solution se conserve une semaine au réfrigérateur.

2) Tampon phosphate pH 7,7.

● Phosphate monopotassique à 13,6 g par litre 10 ml

● Phosphate disodique à 35,8 g par litre 90 ml

3) Acide trichloracétique à 5 pour cent.

4) Soude 0,2 N.

5) Réactif de Folin-Ciocalteu; au moment de l'emploi on dilue une partie de ce réactif avec deux parties d'eau distillée.

6) Solution de carbonate de soude à 40 pour cent (CO_3Na_2 , $12\text{H}_2\text{O}$).

7) Solution de l-tyrosine à 20 μg par ml. On met en solution dans un litre d'eau distillée contenant 1 ml d'acide sulfurique N, vingt mg de tyrosine.

— *Gamme étalon.* Prendre une série de onze tubes à essais et introduire :

- 5 ml de soude 0,2 N;
- 0 - 0,1 - 0,2 - 0,3... 1 ml de la solution de tyrosine;
- 1 - 0,9 - 0,8 - 0,7... 0 ml d'eau distillée;
- 1 ml de réactif de Folin;
- 1 ml de la solution de carbonate de soude.

Agiter par retournements. Laisser la coloration se développer pendant 20 minutes. La courbe d'activité protéolytique est tracée en portant en ordonnée les densités optiques et en abscisse les pourcentages d'hydrolyse.

— *Technique.* Les solutions enzymatiques pouvant contenir des peptides et des acides aminés non précipitables par l'acide trichloracétique, il sera nécessaire de préparer un témoin correspondant à chaque dilution dosée.

§ Préparer deux tubes à centrifuger A et B contenant 4 ml d'acide trichloracétique.

§ Préparer un tube à hémolyse contenant :

- 1 ml de solution de caséine;
- 1 ml de tampon 7,7;
- 1 ml de la solution enzymatique à étudier.

Agiter. Prélever dans le tube à hémolyse 1 ml que l'on ajoute au tube à centrifuger A qui sera le témoin. Agiter.

§ Porter le tube à hémolyse au bain-marie à 37 °C le temps nécessaire.

§ Après incubation prélever dans le tube incubé 1 ml que l'on ajoute dans le tube à centrifuger B. Agiter. Repos 30 minutes. Centrifuger les tubes A et B (3 minutes à 5 000 t).

§ Dans deux tubes à essais contenant 5 ml de soude, on ajoute 1 ml de centrifugeat, 1 ml de réactif de Folin, 1 ml de carbonate de soude. Agiter. Repos 20 minutes. Lire au photomètre.

N.B. Les temps d'incubation seront de dix, vingt, quarante et quatre-vingts minutes.

Le pouvoir protéolytique mesuré par l'activité caséinolytique, a été étudié sur les sept préparations suivantes :

- Assibiol*
- Chymalgyl*
- Chymodrex*
- Eupepsa*
- Extranase*
- Flaviastase*
- Pancrex*

TABLEAU III. — POUVOIR CASEINOLYTIQUE

Dilu- tion	1/125	1/165	1/250	1/500	1/1 250	1/1 650	1/2 500	1/5 000	1/12 500	1/16 500	1/25 000	1/33 000	1/50 000	1/100 000	Incubation
B C E J K M R	30	20	14	6	5	2	2	1							10 mn
B C E J K M R	42	31	20	9	11	6	5				5 5 5	2 4 4	1 2 3	1 3	20 mn
					40	30	4		4	4	2 4	4	2 3	1	
B C E J K M R	70	45	23	11	35	19	16	7			5 6 5	3 4 5	1 3 3	2 3	40 mn
					80	60	4		5	4	7	1 7	1 6	3	
B C E J K M R					80	60	30	15			15 14 7	7 9 5	4 5 3	3 3 3	80 mn
							6				11	11	6	3	

POURCENTAGE DE SUBSTRAT HYDROLYSE
EN CONSIDERANT LE TEMPS D'INCUBATION ET LA DILUTION

Nous devons préciser que parallèlement à l'étude de Chymodrex*, nous avons mené celle de Chymoral* et de Chymocycline*, identiques dans leurs constituants enzymatiques. Les résultats obtenus sont, aux erreurs d'expérience près, exactement superposables.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau III; ils sont constitués par les moyennes de cinq essais.

La majorité des préparations présentent une activité pour des dilutions relativement faibles; pour un temps d'incubation de quarante minutes les résultats ne sont plus interprétables au-delà du 1/5 000. Il semblerait que des temps d'incubation plus prolongés auraient donné des indications plus complètes.

Pour une dilution au 1/25 000 et pour un temps d'incubation de quatre-vingts minutes, on peut citer le plus fort pourcentage de substrat hydrolysé : 15 pour cent, et le plus faible : 7 pour cent.

En conclusion il apparaît, à la suite de ces différents essais, que l'activité caséinolytique est relativement faible et lente à mettre en évidence.



CHAPITRE IV

Pouvoir Cellulasique

Le problème de la détermination de l'activité des cellulases a été exposé dans un grand nombre de publications. En particulier le choix d'une méthode valable à la fois pour l'essai d'une cellulose commerciale et pour le contrôle d'une préparation galénique, est délicat. L'expression des résultats enfin est hétéroclite quant aux unités, et il est difficile de comparer les résultats entre eux (114).

Les conditions de pH et de température sont sensiblement identiques dans toutes les méthodes. Il n'en est pas de même du substrat et de l'appréciation du degré d'hydrolyse de ce substrat.

Le premier substrat qui vient à l'esprit est la cellulose naturelle. Certains auteurs, tel HALIWELL (79, 80), utilisent de la poudre de cellulose pour chromatographie. Mais cette cellulose naturelle n'est pas parfaitement attaquée par l'enzyme si elle n'a subi auparavant un traitement qui favorise leur hydratation.

La plupart des travaux sont donc basés sur l'emploi de dérivés de la cellulose. LEVINSON (104), THOMAS (173), TRACEY (176), travaillent sur la carboxyméthylcellulose. Sanderger et Enebo (155) proposent l'utilisation de l'éthylhydroxyéthylcellulose. DESARMENIEN et BASTIEN (57), dans les trois méthodes qu'ils présentent, ainsi que MENZIANI et SILVA (113), utilisent la méthylcellulose, plus pure (139). Un examen critique de l'emploi de la carboxyméthylcellulose comme substrat a été fait par COURTOIS et Coll. (42). Enfin KARRER (93) effectue ses essais sur la cellophane. TERUO IWASAKI (88) présente une méthode de détermination de l'activité cellulasique avec la glycol cellulose comme substrat.

Quant au critère d'hydrolyse du substrat, il y a encore le choix. Les méthodes dont on dispose sont le plus généralement viscosimétriques, réductimétriques et gravimétriques.

Les méthodes viscosimétriques où l'on détermine la diminution de viscosité du substrat sous l'action de l'enzyme, ont été utilisées par DESARMENIEN (57), MENZIANI (113), et Thomas (173). Cette méthode est très sensible pendant la phase initiale de l'action du ferment surtout, ERIKSON (66).

Les méthodes réductimétriques semblent traduire d'une façon plus complète l'action fermentaire totale. Pour déterminer l'augmentation du pouvoir réducteur, COLBRAU (38), FESTENSTEIN (67), JERMYN (90), ont recours à des méthodes volumétriques : oxydation des sucres réducteurs par l'hypiodite ou réduction des réactifs cuivriques. HIRSCH (83), WHISTLER (180), et WHITAKER (181, 182) ont travaillé selon la même technique. SUMMER (172) utilise une méthode colorimétrique : réduction de l'acide D.N.S. et coloration du produit réduit. Ces méthodes réductimétriques restent les seules transposables in vitro, pour des examens pratiqués sur les selles par exemple.

Enfin DUNCAN (65), KARRER (93), pratiquent une méthode gravimétrique où, connaissant le poids du substrat mis en expérience, on détermine celui qui reste après action de l'enzyme.

On peut encore citer la méthode pondérale sur la cellophane, de DESARME-NIEN (57), très simple et bien applicable aux formes pharmaceutiques puisque ni les sucres, ni les excipients, n'apporteraient de troubles considérables.

Une étude très récente a été faite sur ce sujet par COURTOIS (43). L'auteur et ses collaborateurs présentent quelques remarques qui doivent présider au choix d'une méthode de dosage des cellulases, et qui portent sur les conditions dans lesquelles il convient d'aborder l'étude de la standardisation du contrôle des préparations pharmaceutiques contenant des cellulases et hémi-cellulases. Il faut considérer tout d'abord l'influence de l'origine des préparations; nous connaissons en effet des cellulases d'origine animale, bactérienne et fongique. C'est dans ce dernier groupe que nous rencontrons la presque totalité des cellulases pharmaceutiques actuellement utilisées. Les protocoles opératoires devront être adaptés à chaque préparation selon l'origine.

Dans un second chapitre (44) les auteurs étudient la préparation et les méthodes d'analyse applicables au substrat qu'ils ont retenu : la carboxyméthyl-cellulose.

Enfin dans une troisième partie (44) ils exposent les résultats obtenus en mettant la carboxyméthylcellulose en présence de diverses préparations pharmaceutiques à cellulases et hémi-cellulases : nécessité de constituer un essai témoin en l'absence de substrat, et nécessité d'effectuer une incubation ne dépassant pas quelques heures en raison de la destruction progressive de l'activité cellulasique. N.B.

L'action successive de plusieurs enzymes sur les substrats cellulosiques ainsi que l'état physique du substrat, ont d'importantes conséquences dans l'interprétation des résultats.

Pour Courtois la difficulté réside, à juste titre, dans la complexité des préparations utilisées. Les résultats de ses recherches sont obtenus avec la carboxyméthylcellulose.

N.B. Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à Monsieur le Professeur Courtois et à Madame Bui Khac Diep pour l'extrême obligeance dont ils firent preuve à notre égard en nous communiquant les résultats des recherches qu'ils mènent dans ce domaine.

Technique utilisée.

La technique que nous avons retenue est dérivée des méthodes de LEVINSON, REESE (104) et SUMMER (171).

— *Principe.* Dosage des sucres réducteurs produits au cours de l'hydrolyse d'une solution de carboxyméthylcellulose à un pour cent, à 37 °C, pendant une heure en milieu tampon de pH 4,6 par la solution enzymatique.

— *Réactifs.* 1) Tampon. A quarante g de soude en pastilles dissoutes dans 300 ml d'eau, ajouter 118 ml d'acide acétique pur cristallisable contenu dans 300 ml d'eau. Refroidir. Amener à un litre.

2) Substrat. Carboxyméthylcellulose : Blanose RP 210. Disperser cinq g de Blanose dans 500 ml d'eau contenant 50 ml de tampon pH 4,6. Verser en pluie la Blanose dans l'eau soumise à une agitation rapide. Agiter trente minutes. Laisser au repos une dizaine d'heures. Agiter dix minutes et filtrer sur verre fritté n° 2. Ajuster le pH s'il y a lieu. Conservation une semaine à + 4 °C.

3) Solution normale de soude.

4) Solution de soude à 4,5 pour cent.

5) Solution d'acide 3-5 dinitrosalicylique à 1 pour cent.

6) Tartrate de sodium et de potassium.

7) Phénol cristallisé.

8) Solution de soude à 10 pour cent.

9) Bisulfite de soude poudre (Métabisulfite).

10) Réactif D.N.S. A 150 ml d'une solution de soude à 4,5 pour cent ajouter 140 ml d'une solution d'acide 3-5 dinitrosalicylique à 1 pour cent et 127,5 g de sel de seignette.

A cinq g de phénol cristallisé ajouter 11 ml d'une solution de soude à 10 pour cent. Ajouter de l'eau pour dissoudre et amener à 50 ml. A 34,5 ml de cette solution de phénol, ajouter 3,45 g de bisulfite de soude.

Ajouter cette dernière solution à celle d'acide 3-5 D.N.S. Bien agiter. Conserver un an en flacon brun bien bouché. Trois ml de ce réactif doivent contenir par titration avec la phtaléine comme indicateur l'équivalent de 5 à 6 ml d'une solution de soude N/10.

11) Solution de glucose à 0,50 g pour un litre.

— *Technique.* Dans un tube jaugé à 25 ml on introduit :

- | | |
|------------------------------|------|
| ● Substrat | 1 ml |
| ● Solution enzymatique | 1 ml |

Agiter. Porter au bain-marie le temps déterminé.

Pendant l'incubation préparer un autre tube jaugé à 25 ml et y introduire aussi 1 ml de substrat et 1 ml de la solution enzymatique.

Sortir les tubes du bain-marie. Ajouter dans tous les tubes (essai et témoin).

- | | |
|-----------------------|------|
| ● Soude normale | 1 ml |
| ● Réactif D.N.S. | 3 ml |

Porter au bain-marie bouillant cinq minutes. Refroidir. Compléter à 25 ml. Agiter. Repos dix minutes. Lire au photolorimètre. Le tube non incubé sert de témoin. Il est bon de joindre un tube contenant 2 ml d'eau distillée, 1 ml de soude et 3 ml de réactif D.N.S. afin de faire le zéro de l'appareil.

— *Gamme étalon.* Prendre une série de onze tubes numérotés de zéro à dix, jaugés à 25 ml où l'on met successivement :

- Glucose étalon 0 - 0,1 - 0,2... 1 ml
- Eau distillée 1 - 0,9 - 0,8... 0 ml
- Eau distillée 1 ml dans tous les tubes
- Soude N 1 ml dans tous les tubes

Agiter. Ajouter dans tous les tubes :

- Réactif D.N.S. 3 ml

Agiter et porter les tubes au bain-marie bouillant pendant cinq minutes. Les retirer et les refroidir sous un courant d'eau. Ajuster à 25 ml. Agiter par retournement. Lire après dix minutes au photolorimètre à 540 m μ . La coloration est stable 24 heures.

N.B. Les temps d'incubation sont de trente minutes, une, deux, trois, six heures.

L'activité cellulasique a été étudiée sur les sept préparations suivantes :

- Cotazym*
- Festale*
- Flaviastase*
- Hélicidine*
- Pancréanne Cellulase Enfant*
- Pancréanne Cellulase Adulte*
- Pantozyme*

Au cours de cette étude il nous a été donné de travailler sur une préparation à base d'extraits de mucus d'escargot. De nombreux auteurs, et notamment QUEVAUVILLER (143), BASTIDE (17), et BALLADE (11) ont signalé et étudié la richesse enzymatique du mucus d'*Helix Pomatia*. On signale ainsi dans le suc digestif une trentaine d'enzymes, et notamment une cellulase très active. Mais il faut préciser que dans cette spécialité, l'activité cellulasique, n'est pas recherchée en tant que telle, mais surtout grâce à son pouvoir mucolytique et par là, à son activité bactéricide, et inhibitrice sur les cultures de bacille coquelucheux de Bordet-Gengou.

C'est sur cette propriété qu'est basée la technique décrite par Mainil (108) permettant de définir l'unité « Hélicidine » que nous présentons ici en raison de son caractère particulier et différent de ceux des autres unités rencontrées dans cette étude. On a défini arbitrairement une unité inhibitrice comme suit : « Contient vingt unités inhibitrices par millilitre, toute solution d'extraits de

TABLEAU IV. — POUVOIR CELLULASIQUE

Dilution	1/60	1/80	1/125	1/250	1/330	1/500	1/1 000	1/1 250	1/1 630	1/2 500	1/5 000	1/12 500	1/25 000	1/50 000	Incubation
G L M P Na Ne Q	41	40	31	35 24 23 10	34 22 10	31 10 5	25 10 5								30 mn
G L M P Na Ne Q	55	52	37	43 29 25 22	42 24 20	40 20 20	29 20 10								1 h
				30	30	29	28	32	29	40 23	26 10				
G L M P Na Ne Q	89	68	53	55 37 32 25	55 30 24	49 25 22	38 24 20								2 h
				34	33	32	30	44	38	59 32	40 23				
G L M P Na Ne Q				25	25	20	20								3 h
										85 38	51 29				
G L M P Na Ne Q				43 24	39 22	37 22	34 20								6 h
				48	42	42	39	88	70	54	35	51	33	24	

POURCENTAGE DE SUBSTRAT HYDROLYSE
EN CONSIDERANT LE TEMPS D'INCUBATION ET LA DILUTION

mucus d'*Helix Pomatia*, déterminant dans les conditions de l'expérience, une auréole de 20 mm de diamètre sur une culture bien déterminée d'*Hémophilus pertussis*. »

Les résultats, constitués par les moyennes de cinq essais, sont rassemblés dans le tableau IV.

La plupart des préparations étudiées donnent des résultats significatifs à des dilutions allant du 1/250 au 1/5 000. Des temps d'incubation de une heure ou deux heures donnent de bonnes indications.

Là encore ces chiffres montrent qu'il est impossible d'établir une proportionnalité constante dans la progression de l'activité, entre les dilutions d'une part, et entre les différents temps d'incubation de l'autre. La complexité des préparations utilisées est à mettre en cause.

Pour une dilution au 1/5 000 et un temps d'incubation de une heure, le plus fort pourcentage de substrat hydrolysé est de 26 pour cent, le plus faible de 10 pour cent.

En conclusion, il apparaît que l'activité cellulasique mesurée au cours de ces essais est très importante mais disparaît rapidement avec l'augmentation de la dilution, tandis que l'incubation doit être de courte durée en raison de la fragilité de l'enzyme.



CHAPITRE V

Pouvoir Lipolytique

La lipase pancréatique est une estérase capable d'hydrolyser les esters du glycérol et des acides gras de longue chaîne, les triglycérides de poids moléculaire élevé. DESNUELLE (60) a montré récemment que la caractéristique de la lipase pancréatique est d'agir uniquement sur les esters émulsionnés. L'enzyme étant hydrosoluble, son activité lipolytique est limitée à la surface des globules graisseux et se trouve facilitée par la présence d'agents émulsionnants naturels ou artificiels, GOUNELLE (75).

Les pharmacopées qui prescrivent l'essai de la lipase proposent des méthodes divergentes notamment en ce qui concerne la nature du substrat utilisé, de MOERLOOSE (54), le Codex Français, VII^e édition de 1949, prescrit une émulsion de tributyrine; la pharmacopée italienne, l'huile d'olive; la pharmacopée anglaise, une solution de triacétine.

La méthode italienne est voisine de celle proposée par WILLSTAETTER (183) qui actuellement avec la méthode de BALLS (12, 13), est le plus souvent adoptée pour déterminer l'activité lipolytique des extraits pancréatiques ou autres préparations de lipase. La détermination est faite en présence de sels biliaires et d'ions Ca^{++} . La méthode de WILLSTAETTER a été modifiée par BAUER et WILSON (21). Ces auteurs effectuent leurs essais en présence de Bentonite, agent de dispersion de l'huile, émulsionnant, capable de jouer le rôle de tampon. PESEZ et WILLEMART (133) ont présenté la méthode qu'ils ont retenue et adoptent comme substrat une émulsion fine de tributyrine dans une solution de cholate de sodium en tampon glyco-colle-soude. Après une incubation de deux heures à 40 °C on ajoute du formol neutre et on dilue à l'alcool pour dissoudre la tributyrine. Le titrage est effectué en solution homogène par la potasse alcoolique.

De nombreux auteurs ont mesuré l'activité de la lipase avec une émulsion d'huile d'olive, par détermination titrimétrique ou manométrique des acides gras libérés. On peut citer par exemple CHERRY et CRANDALL (33), COMFORT et OSTERBERG (40), GOLDSTEIN et ROE (73), ADAMS et WHITTAKER (1),

TIETZ (175), qui utilisent une émulsion d'huile d'olive stabilisée par la gomme arabique et le benzoate de soude. BORGSTROM (27) encore, utilise une émulsion huileuse, mais la détermination est néphélométrique.

Ces méthodes présentent le désavantage des émulsions instables dont le degré de dispersion varie beaucoup. Dans ces conditions le contact enzyme-substrat est variable d'un essai à l'autre, et les résultats obtenus sont donc différents parfois pour une même pancréatine. Certains auteurs, Archibald (9), Boissonas (26), Sarda (156), Schonheyder (159), Fiore (69) notamment, ont proposé des substrats solubles tels la triacétine, la tripropionine ou les *tweens*, pour éviter les difficultés dues aux substrats insolubles. Mais ces substrats sont également hydrolysés par les estérases accompagnant la lipase.

Une technique potentiométrique a été proposée par DESNUELLE (3) et AILHAUD (2). Le substrat utilisé est une émulsion stable préparée avec de la gomme arabique. L'activité lipolytique est déterminée en fonction du temps. C'est ce principe qui a été retenu par de MOERLOOSE et RUYSSSEN (53). Les auteurs proposent d'employer une émulsion d'huile d'olive en ajoutant du désoxycholate de sodium pur qui favorise l'activation des sels biliaires.

Quelques méthodes physiques ont été proposées. DESBORDES (58), RONA (148), WILLSTAETTER (184), ont présenté la stalagmométrie qui tient compte de l'abaissement de tension superficielle d'une solution aqueuse saturée de tributyrine sous l'action de la lipase libérant l'acide gras. AMMON (4), RONA (149) ont travaillé avec une méthode manométrique, en appareil de Warburg, qui apprécie l'anhydride carbonique dégagé en quantité proportionnelle à l'acide libéré par l'enzyme. La néphélométrie a été utilisée par RONA (150) pour déterminer les variations de turbidité d'une émulsion huileuse. SIEGEL et ECANOW (166) ont présenté une méthode basée sur le même principe. Les auteurs exposent ainsi une méthode simple qui ne réclame généralement pas plus de trente minutes pour sa mise en œuvre.

La température et le pH du milieu incubé, la durée de la période de digestion, le type et la quantité de l'activateur employé, ont les plus grands effets sur l'activité lipolytique. Dans sa méthode, LAZOWASEM (102) introduit de la bile de bœuf, qui, contenant des dérivés choliques et désoxycholiques de la taurine et de la glycine, fait fonction d'activateur de la lipase dans le but de reproduire les conditions physiologiques. On a remarqué cependant qu'en activant la lipase par addition de certains sels biliaires comme le désoxycholate de soude, et de stabilisateurs divers tel l'ion calcium, en excès par rapport à la quantité physiologique, la digestion des graisses est augmentée très largement.

Les modes opératoires appliqués par les pharmacopées française et anglaise (28) ne tiennent pas compte du fait que l'action de la lipase, maximum entre pH 8 et pH 9, est abaissée pour les pH plus acides. Un abaissement du pH survient pourtant dès la mise en liberté des acides gras. Pour éviter cette acidification du milieu, BULLOCK (31) propose d'ajouter goutte à goutte au cours de l'hydrolyse, une solution alcaline diluée, en présence d'un indicateur coloré ou en mesurant le pH, afin de la maintenir au voisinage de la neutralité.

WILLSTAETTER (184) a longuement étudié l'action de la lipase sur l'huile d'olive, en milieu tamponné à pH 8,9 et en présence d'activateurs tels que l'oléate de sodium, l'albumine, le chlorure de calcium. Mais l'hétérogénéité du milieu et

La volatilité de l'ammoniaque employé comme tampon, gênent la reproductibilité des résultats. Malgré l'emploi de bentonite par BAUER (21) comme agent de dispersion, le virage final est difficile à apprécier.

La technique de PENAU et GUILBERT (132) permet l'hydrolyse à pH constant, le milieu réactionnel étant additionné de gélose et tamponné par le glycolle et la soude à pH 9. Le temps de digestion à 40°C est de deux heures.

Enfin il faut citer la neutralisation de l'activité enzymatique et la précipitation spécifique de la lipase par l'anti-lipase, de GONZALEZ (74).

Technique utilisée.

La technique que nous avons retenue est celle de SELIGMAN et NACHLAS (165), modifiée par DAVID, THIEBLOT, BASTIDE et DASTUGUE (49).

Principe. — Après hydrolyse enzymatique du β naphthyl laurate, le β naphthol libéré est transformé en colorant azoïque par addition de sel de diazonium. Le pigment insoluble est extrait à l'acétate d'éthyle et la coloration obtenue est mesurée au photocolorimètre. Dans ces conditions, estérases non spécifiques et lipases interfèrent dans la réaction.

La différenciation se fait à l'aide du taurocholate de soude qui inhibe les estérases et active la lipase. Les valeurs obtenues sans taurocholate correspondent à l'activité estérasique non spécifique. En présence de lipase les déviations optiques des tubes contenant du taurocholate sont plus élevées que dans le cas précédent: on admet que la différence entre les deux taux correspond à l'hydrolyse due à la lipase.

Réactifs. — 1. Solution acétonique de β naphthyl laurate à 50 mg pour 100 ml. Conservation à + 3° deux jours.

2. Tampon barbital pH = 7,4 (Michaelis):

Barbital sodique à 20,62 g/1 000	58 ml
HCl 0,1 N	42 ml
Eau distillée q.s.p.	200 ml

3. Substrat extemporané:

Solution de β naphthyl laurate	5 ml
Tampon véronal	10 ml
Eau distillée q.s.p.	50 ml

4. Solution de taurocholate de soude (Sodium taurocholate accelerator lipase-N.B.Co) à 4,3 g pour 100 ml d'eau distillée. Conserver à + 3° quelques jours.

5. Solution extemporanée de diorthoanisidine tétra azotée dans l'eau glacée à 4 mg par ml.

6. Solution d'acide trichloracétique à 40 pour cent.

Technique. — a) Introduire dans trois tubes à essais A, B, C :

Substrat : 5 ml.

puis dans le tube A : Eau distillée : 1 ml.

puis dans le tube B : Taurocholate : 1 ml.

puis dans le tube C : Taurocholate : 1 ml.

enfin dans les tubes A et B : Solution enzymatique : 1 ml.

b) Porter au bain-marie à 37°C une, deux, trois, quatre, six et huit heures.

c) Plonger alors les tubes dans l'eau glacée. Après refroidissement complet, introduire dans tous les tubes :

Diorthoanisidine : 1 ml.

Agiter. Repos deux minutes.

Acide trichloracétique : 1 ml.

Acétate d'éthyle : 10 ml.

Agiter. Centrifuger.

d) Prélever en partie le surnageant et passer au photolorimètre à 575 m μ . Faire le zéro de l'appareil avec le surnageant du tube C.

Gamme étalon. — 1) Solution acétonique de naphtol à 22 mg pour 100 ml.

2) Solution d'étalonnage :

Naphtol acétonique : 5 ml.

Tanipon barbital : 10 ml.

Eau distillée q.s.p. : 50 ml.

On prend onze tubes numérotés de 0 à 10. Introduire successivement 0 - 0,5 - 1 - 1,5... 5 ml de la solution étalon. Compléter par 5 - 4,5 - 4 - 3,5... 0 ml d'eau distillée. Effectuer les mêmes opérations que pour l'essai lui-même, incubation exceptée.

TABLEAU V. — POUVOIR LIPOLYTIQUE.

Dilutions	1/125	1/165	1/250	1/500	1/12 500	1/16 500	1/25 000	1/33 000	1/50 000	1/100 000	Incubation
A G H J L M Ne	5	4	3	1	12	10	7		4		1 h
	5	4	3	1	5	4	4		1		
						11	6		5		
						15	9		6		
					10	3					
A G H J L M Ne	7	6	4	1	24	20	14		9		2 h
	5	3	1		14	11	8		4		
						18	17		6		
						23	15		8		
					12	10	6		3		
A G H J L M Ne	9	7	4	2	41	30	24		14		3 h
					20	22	16		6		
						28	23		12		
						41	34		21		
					14	13	12		4		
A G H J L M Ne	5	4	3	1	48	36	24		16		4 h
					31	24	16		8		
						28	20		10		
							29	26	10	8	
A G H J L M Ne	25	25	18	6	58	34	33		20		6 h
					45	42	30		16		
							64		34	20	
							44	37	25	19	
					32	27	18	43	17		

POURCENTAGE DE SUBSTRAT HYDROLYSE EN CONSIDERANT LE TEMPS D'INCUBATION ET LA DILUTION.

L'activité lipolytique a été étudiée sur les sept préparations suivantes :

- Askenzyme*
- Cotazym*
- Enzypan*
- Eupepsa*
- Festale*
- Flaviastase*
- Pancréanne cellulase adulte*

Il faut signaler que la lipase des Aspergillacées est active en milieu faiblement acide. L'activité décelée par nos essais à pH 7,4 est donc faible par rapport à la normale si on veut la comparer à celle obtenue à pH optimum.

Les moyennes de nos résultats sont rassemblées dans le tableau V et nous les condons dans les quelques lignes suivantes.

La plupart des préparations étudiées présentent une activité à des dilutions allant du 1/12 500 au 1/50 000, avec les variations normales correspondant à la nature de chaque produit.

Des temps d'incubation de deux heures ou trois heures paraissent suffisants pour obtenir de bons résultats.

Pour une dilution au 1/50 000 et un temps d'incubation de trois heures, le plus fort pourcentage de substrat hydrolysé est de 21 pour cent, le plus faible de 10 pour cent.

En conclusion, il apparaît que l'activité lipolytique relevée est relativement importante et lente à mettre en évidence.



TROISIEME PARTIE

CHAPITRE I

Discussion

Devant un développement aussi rapide des indications thérapeutiques des préparations enzymatiques et de la multiplication de celles-ci, la question de l'appréciation des activités enzymatiques de ces préparations devient d'une brûlante actualité.

Or, le dosage d'une enzyme représente quelque chose d'extrêmement complexe dans la plupart des cas. Evidemment le mode d'expression le plus satisfaisant au point de vue théorique serait comme le rappelait encore récemment GURTOIS (41), de pouvoir indiquer soit le poids de l'enzyme, pour cent ou mille g d'échantillon analysé, soit la concentration en millième ou millionième de molécule par litre.

Mais en fait aucune technique standard n'a été officiellement indiquée pour l'extraction, la purification, et l'obtention quantitative à l'état pur d'une enzyme, aussi bien à partir d'une préparation médicamenteuse complexe, que d'un substrat biologique déterminé.

Nous nous trouvons donc un peu pour les enzymes, au même stade qu'il y a un certain nombre d'années, pour les hormones et les vitamines, qui à ce moment-là, n'étant connues pour la plupart d'entre elles, que sous la forme d'extraits grossiers et non pas de substances pures, ne pouvaient être dosées qu'approximativement et indirectement à l'aide de tests biologiques plus ou moins complexes et plus ou moins bien adoptés par tous, bien que par ailleurs il existât des enzymes cristallisées.

En d'autres termes, à l'heure actuelle, l'expression employée couramment de « dosage d'enzymes » est plus ou moins un leurre. Il serait plus correct de dire que l'on cherche à apprécier une activité enzymatique dans des conditions déterminées.

Le problème s'est surtout posé jusqu'à présent en chimie clinique où l'on emploie encore couramment pour l'appréciation de la même activité enzymatique, des substrats différents, naturels dans un cas, synthétiques dans l'autre, en exprimant les résultats sous la forme d'unités arbitraires, variées, sans relation entre elles. Leur interprétation et la conversion de ces unités d'usage courant est une source d'incompréhension et de confusion entre les cliniciens.

Qu'en est-il du point de vue pharmacologique ?

De nombreuses méthodes de contrôle ont été décrites ou mentionnées au cours de notre étude, qui, tout en n'étant pas de valeur absolue, permettent cependant d'évaluer l'activité enzymatique avec suffisamment de sécurité. Outre les tests de diverses Pharmacopées, les Laboratoires et les Fabricants ont établi leurs propres méthodes de dosage. Elles sont le plus souvent adaptées à leurs besoins immédiats et possèdent des mérites variables, mais les méthodes et les valeurs des unités choisies ne sont pas nécessairement comparables aux autres méthodes et systèmes d'unités employés ailleurs.

C'est ainsi qu'au cours de cette étude, nous nous sommes trouvés en présence de systèmes d'unités d'activité proposés par le Codex Français. Il est à remarquer d'ailleurs que l'on trouve dans ses pages, davantage une valeur minimum imposée, plutôt qu'un dosage d'activité enzymatique proprement dit. La VII^e édition de 1949 consacre deux de ses chapitres à la Pancréatine et à la Pepsine.

Pour la première, le Codex définit une activité amylolytique (135) de titre 100; l'essai est effectué à partir d'une solution d'amidon à dix g pour 250 ml en milieu tampon acétate de pH 5,7 et le maltose formé est dosé par la méthode de Bertrand (141). Le poids d'amidon transformé en maltose doit être compris entre 20 et 40 % du poids d'amidon mis en œuvre. Le titre du produit officinal doit être égal au moins à 100.

L'activité protéolytique (134) est de titre 50; l'essai est une digestion de la Fibrine de porc pendant six heures à 50 °C et le dosage est conduit par formol-titration. On titre à l'aide d'une solution de soude N/10, en présence de phénolphthaléine comme indicateur coloré. La pancréatine protéolyse cinquante fois son poids de fibrine essorée fraîche.

L'activité lipolytique enfin, correspond à l'hydrolyse d'une solution de tributyrine dans la limite de 20 %; la solution de tributyrine est maintenue à 38 °C pendant dix minutes; puis on ajoute la pancréatine. Après avoir agité, on laisse trente minutes au bain-marie. Le dosage est fait à l'aide d'une solution de soude N/10 en présence de phénolphthaléine comme indicateur coloré. On ne doit pas utiliser moins de 6 ml de soude N/10, ce qui correspond à 20 % de tributyrine hydrolysée.

Pour la Pepsine, une activité protéolytique est définie par l'état de limpidité d'une solution de Fibrine de porc après une digestion de six heures à 50 °C, après addition de 1 ml d'acide nitrique, (136).

Le problème est évidemment plus difficile quand il s'agit d'un mélange d'enzymes, comme c'est le cas pour les produits présentés dans ce travail.

Aussi la Commission de la Pharmacopée, s'est-elle abstenue de remanier pour la VIII^e édition de 1965 les chapitres « Pancréatine », « Pepsine » et « Papaine » du précédent Codex, car aucune méthode utilisant un substrat naturel ne lui paraissait satisfaisante.

Par contre le nouveau Codex s'est rallié dans ses monographies « Trypsine » et « Chymotrypsine » aux récentes normes fixées par la Fédération Internationale de Biochimie. L'activité trypsique est étudiée en utilisant comme substrat l'ester éthylique de la benzoyl arginine; l'unité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole du substrat considéré, par minute, dans les conditions de l'expérience. Le produit doit titrer trente unités par milligramme de produit sec (140).

Dans le cas de l'usage des substrats Caséine ou Hémoglobine, il faudrait trouver un moyen « moderne » d'expression des unités d'activité protéolytique. Storck a récemment proposé comme unité la « quantité d'enzyme, ou de mélange enzymatique, qui libère une millimole ou une micromole d'azote aminé, en N, en une minute à 37 °C, au pH optimal ». Le dosage serait une formol-titration conduite par potentiométrie.

Il nous a été donné de rencontrer une autre unité d'activité protéolytique : l'unité Armour, définie par la méthode de Anson modifiée (6). C'est la quantité de chymotrypsine ou de trypsine cristallisée qui, après une incubation à 25 °C ($\pm 0,10$ °C) pendant dix minutes, avec une préparation convenable d'hémoglobine pure à pH 7,5, entraîne la décomposition de l'hémoglobine à un point tel que la quantité de substances hydroxyarylés libérée, donnera avec le réactif des phénols de Folin-Ciocalteu, une coloration d'intensité égale à celle donnée par $5,52 \times 10^{-5}$ millimole de trypsine ou encore un μg de tyrosine avec ce même réactif.

Il est possible de faire la comparaison suivante :

— Une Unité Armour = 1/200 000 Unité Anson (6)
= 1/200 Unité C.Hb.
= 1 Unité National Formulary (122)

(Trypsine ou Chymotrypsine dosée isolément.)

L'unité C.Hb. ou Chymotrypsine-Hémoglobine, est la quantité d'alphachymotrypsine, libre de toute autre protéase, qui donne à la température de 25 °C, et par minute, des produits de digestion de l'hémoglobine non précipitables par l'acide trichloracétique, tels que leur concentration corresponde à une densité optique de 1, mesurée au spectrophotomètre à 280 m μ .

Le pouvoir caséinolytique a été défini en unités Anson (6), correspondant à la quantité d'enzyme qui, dans les conditions de l'expérience, libère à partir de la solution de caséine une quantité de produits non précipitables par l'acide trichloracétique à 5 % et donnant, avec le réactif de Folin, la même densité optique lue à 650 m μ que 0,4 μg de tyrosine.

Il faut citer encore l'unité Rorer (109), unité conventionnelle d'activité protéolytique et qui est la quantité d'enzyme qui détermine à 27 °C sur un substrat standard de caséine de pH 7, dans les conditions de l'expérience, une hydrolyse,

se traduisant par une modification de l'absorption de la lumière ultraviolette à 280 m μ , de 1.10^{-5} par minute de temps de réaction.

Le pouvoir gélatinolytique est défini par le fait que 0,5 unité gélatinolytique est la quantité d'enzyme capable de liquéfier, dans les conditions de l'expérience, une zone hémicirculaire de gélatine d'un diamètre égal à 17,5 mm. La gélatine est une solution « grénétine » (Prolabo à 8 % dans un tampon phosphate 0,1 M, à pH 7,2. On ajoute après liquéfaction 0,5 % de germibac (Sinnova) dilué au 1/100. La solution est répartie en boîtes de pétri de dix cm à raison de trente ml par boîte, CARTER (32).

Les solutions à doser, convenablement diluées, sont imprégnées sur des disques type antibiotiques, de dix cm de diamètre, et qui absorbent environ 1/20 de ml. On en dispose quatre par boîte. Les boîtes sont alors portées à l'étuve à $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ pendant quinze heures.

Il nous a été possible également de relever, en ce qui concerne l'activité amylolytique, les notions de pouvoirs dextrinant et saccharifiant. Le premier, mesuré par une méthode dérivée de celle de WOHLGEMUTH (185), correspond à la quantité d'enzyme qui, dans les conditions de l'expérience, réduit de moitié, en quatre minutes, la quantité d'amidon soluble mis en digestion. Le second, apprécié au moyen d'un dosage de sucres réducteurs, par la méthode de Bertrand est défini par la quantité d'enzyme qui, dans les conditions de l'expérience, libère un ctg de maltose à partir d'une quantité connue d'amidon soluble.

Le pouvoir amylolytique peut également être évalué à l'aide du dosage iodométrique selon WILLSTAETTER et exposé par BAMAN et MYRBACK (15).

En ce qui concerne l'activité cellulasique, MESNARD et Coll. (115) expriment les résultats soit en pourcentage de substrat hydrolysé, soit en millig. de substrat qu'est capable d'hydrolyser un g d'enzyme. DESARMENIEN et BASTIEN (57) ont défini encore un « Index Cellulasique » : il est égal à 100 si une solution de cellulase à 25 % permet d'obtenir, dans les conditions opératoires définies, une diminution de 50 % de la durée d'écoulement de la solution de substrat (méthylcellulose) en quarante minutes. Il est possible de rapprocher de ce principe la détermination de l'activité cellulasique, par diminution de viscosité d'une pseudo-solution de carboxyméthylcellulose, en comparaison avec une cellulase d'activité connue.

Pour COURTOIS (43), dans l'état actuel de nos connaissances, il n'existe pas de substrat dont l'emploi s'impose sans restriction. Il propose d'apprécier l'activité cellulasique par des essais permettant de mesurer le début de la dépolymérisation d'un substrat cellulosique, et l'activité globale des enzymes hydrolysant les liaisons glucosidiques, en déterminant l'ensemble des oses et saccharides réducteurs libérés par les enzymes associées intervenant successivement. Le ou les substrats utilisés devant être définis par leur mode d'obtention et un protocole analytique rigoureux.

L'activité lipolytique a été déterminée entre autres par DESNUELLE (61) dans les conditions suivantes. L'auteur utilise comme substrat des émulsions stables et monodispersées. Le test s'effectue à l'aide d'une émulsion de trioléine dans une solution aqueuse contenant de la gomme arabique, des sels biliaires et du chlorure de calcium. On plonge dans l'émulsion les électrodes d'un pH mètre,

on amène le pH à 8 ou 9; on ajoute l'enzyme et on maintient le pH constant par addition de quantités connues de soude. L'auteur propose une unité pouvant être définie comme la quantité d'enzyme qui libère dix milliéquivalents d'acide par minute au pH déterminé.

BAUER et WILSON (21) ont défini une unité libérant une quantité d'acide équivalent à un ml de solution de soude alcoolique 0,05 N à partir de un ml d'huile d'olive en trente minutes dans les conditions de l'expérience.

Cette même unité a également été utilisée par LAZO-WASEM (102) pour déterminer l'activité lipolytique des préparations pharmaceutiques destinées à l'administration par voie orale. L'auteur tire sa méthode d'une publication de SAMMONS et Coll. (154) et s'attache à reproduire aussi fidèlement que possible in vitro, les conditions qui règnent au cours d'une digestion normale in vivo.

Il faut également ajouter les unités Pesetz. Cet auteur exprime les résultats en ml de solution de potasse alcoolique 0,2 N. Willstaetter (184) convertit la quantité d'alcali en pourcentage d'huile hydrolysée et exprime l'unité lipase comme la quantité d'enzyme capable d'hydrolyser 24 pour cent de 2,5 g d'huile d'olive ayant un indice de saponification de 185.

Pesetz et Willemart (133), par analogie aux titres amylolytique et protéolytique de la pancréatine qui figurent à la Pharmacopée française de 1949, proposent d'exprimer le pouvoir lipasique par la quantité, en millig. de tributyrine hydrolysée par un millig. de pancréatine.

Pour faciliter la comparaison entre les préparations enzymatiques, il est essentiel d'aplanir les confusions existant au sujet de leurs unités et de leurs méthodes d'essais. Dans ce but il est nécessaire d'adopter un système d'unités qui s'adapte aussi près que possible des préparations pharmaceutiques pour avoir des activités quantitativement comparables. L'activité enzymatique peut être mesurée par l'observation de la vitesse de réaction, calculée elle-même soit par la rapidité de disparition d'un substrat, soit par la rapidité de formation des produits de dégradation.

Une première tentative en vue de prendre certaines mesures pour aboutir à un système d'unités communes, est à mettre à l'actif d'une sous-commission mixte, constituée par l'Union Internationale de Biochimie et l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée, qui s'est réunie à Munich en 1959.

Dans ses conclusions la Commission recommande de définir une unité enzymatique comme représentant « le nombre de micromolécules de substrat transformé par minute dans des conditions opératoires nettement précisées ». La concentration en unités est rapportée à un milligramme ou à un litre de solution enzymatique (174). Des difficultés peuvent résulter de la nature complexe du substrat et de la formation de produits variés après action de l'enzyme. C'est le cas des lipides, des protéines et de l'amidon. Dans ces conditions les unités seront exprimées en micro-molécules de groupements fonctionnels dosés après dégradation enzymatique du substrat.

D'autre part un symposium sur les enzymes en Pharmacie fut organisé à l'occasion de l'Assemblée Générale de la Fédération Internationale Pharmaceutique, à Copenhague en 1960. A l'issue de ce symposium, les participants ont conclu à l'unanimité à la nécessité d'une standardisation à l'échelle internatio-

nale. Une commission internationale s'est ainsi instituée au sein de la section scientifique de la Fédération Internationale Pharmaceutique et au cours d'une de ses premières réunions tenues à Bruxelles en 1961, cette commission a adopté les conclusions du rapport et le système d'unités proposé par l'Union Internationale de Biochimie.

RUYSSEN (152) a résumé les recommandations pour l'étalonnage en unités comme suit :

« — Une unité d'enzyme doit être définie comme la quantité qui catalyse la transformation d'une micro molécule de substrat par minute.

— La température doit être précisée et sera de préférence 25 °C. Les autres conditions, pH et concentration en substrat, doivent être optimales. Afin d'éviter les chiffres trop longs, des unités milli ou unités kilo peuvent être utilisées.

— Les méthodes d'essais auront pour base la mesure de la vitesse initiale de la réaction; la concentration en substrat devra être suffisante pour saturer l'enzyme. Dans les autres cas, la constante de Michaelis devra être mesurée de façon que la vitesse de réaction observée puisse être convertie dans celle qui serait obtenue pour la saturation en substrat. »

Dans le cas où apparaîtrait la nécessité d'exprimer l'activité enzymatique en l'équivalent d'un certain poids d'un étalon international bien défini, il serait recommandé d'adopter les étalons proposés par la section des étalons biologiques de l'O.M.S. à Genève. Toutefois il serait souhaitable d'exprimer l'activité de ces étalons en unités internationales calculées selon les règles de l'Union Internationale de Biochimie.

Plus récemment, la Commission pour la standardisation des Enzymes Pharmaceutiques s'est réunie à Prague, et a résumé ses travaux dans un premier rapport (91).

Les méthodes de standardisation devraient concilier :

a) D'une part les bases scientifiques permettant de définir à l'aide de la réaction catalysée les unités enzymatiques exprimées en fraction de moles du substrat transformé par minute.

b) D'autre part leurs applications pratiques à l'essai d'une préparation pharmaceutique par l'emploi d'un substrat dont le choix pourrait être imposé par la nécessité de serrer de près les applications thérapeutiques.

A ce problème s'ajoutent ceux de la stabilité des enzymes pharmaceutiques ainsi que de leur activation ou inhibition dans leurs associations médicamenteuses, DE MOERLOOSE (56).

Quand on désire appliquer ce système d'unités, il faut avant tout disposer de la possibilité de représenter l'action enzymatique par une réaction simple, qui est celle d'une hydrolyse dans la plupart des cas.

Pour les Protéinases Pharmaceutiques on pourrait faire le dosage à l'aide d'un substrat qui se rapproche le plus possible du substrat naturel. C'est ainsi que les Pharmacopées prescrivent l'emploi de la fibrine de porc ou de blanc d'œuf coagulé. Mais RUYSSEN (152) estime que même les tests limités à l'aide de substrats à propriétés et composition aussi variables donnent des résultats incertains et peu reproductibles. Les résultats ne sont guère meilleurs pour le dosage des protéinases de la Pancréatine à l'aide de la caséine. En effet le poids

moléculaire moyen de ce produit varie avec les conditions de purification ou de préparation de la solution. Il faudrait disposer d'une protéine pure, moléculairement uniforme et définie, ce qui est délicat à réaliser ou bien employer un peptide simple synthétique.

Le problème pourrait être plus aisément résolu si les protéinases pharmaceutiques étaient des préparations pures. Il en est autrement. C'est ainsi que la Pepsine médicale contient la collagénase et la cathepsine, tandis que la composition complexe de la Pancréatine rend la mesure de son activité protéolytique difficile.

La stabilité du substrat au cours du dosage est une condition primordiale; il ne faut pas oublier non plus que les solutions aqueuses d'enzymes manquent aussi de stabilité. RUYSEN et LAUWERS (153) pensent que seul l'emploi d'un substrat de structure chimique simple à propriétés constantes, et susceptible d'être préparé par synthèse, permettra de standardiser les Protéinases en valeur absolue.



CHAPITRE II

Dosage de l'azote total

Dans le but d'avoir une valeur de référence dans la comparaison des résultats obtenus, nous avons effectué pour chaque préparation étudiée un dosage de l'azote total selon la technique de Kjeldahl.

L'azote organique est minéralisé en détruisant le composé par l'acide sulfurique concentré à chaud, en présence d'un catalyseur de minéralisation. L'azote est transformé en ammoniac fixé par l'acide sulfurique puis déplacé par la soude concentrée. On dose par acidimétrie en présence de l'indicateur Duplex.

La méthode que nous avons retenue est une micro-méthode.

Réactifs.

1) Indicateur Duplex :

Duplex concentré : 5 ml (vert de bromocrésol 0,47 g ; rouge de méthyle 0,30 g ; alcool à 95° chaud 250 ml).

Acide borique : 20 g.

Eau distillée q.s.p. : 500 ml.

Faire dissoudre l'acide borique dans 450 ml d'eau chaude. Après refroidissement ajouter 5 ml de Duplex concentré et compléter à 500 ml.

2) Acide sulfurique concentré (50 %).

3) Catalyseur de minéralisation : sulfate de potassium et oxyde de sélénium.

4) Phénolphthaléine en solution alcoolique à 2 %.

5) Lessive de soude.

6) Acide sulfurique N/10.

Technique.

A) Minéralisation.

Introduire dans un matras :

— Substance à minéraliser 0,05 p 0,50 g.

— Catalyseur de minéralisation, soit : sulfate de potassium un g et oxyde de sélénium 0,02 g.

— Acide sulfurique concentré 5 ml.

Chauffer doucement au début, puis à ébullition, maintenue jusqu'à décoloration totale du liquide. Opérer en éliminant les vapeurs dégagées. Laisser refroidir.

B) Entraînement à la vapeur d'eau et dosage.

Introduire la solution minéralisée dans le micro-appareil de Parnass. Rincer le matras avec deux fois 10 ml d'eau distillée. Ajouter les eaux de rinçage. Ajouter 3 gouttes de phtaléine, puis 20 ml de lessive de soude (virage du milieu). Pendant cette opération il est prudent de faire dégager légèrement la vapeur d'eau dans l'appareil afin d'éviter une vidange spontanée. Il est nécessaire de recueillir le produit d'entraînement dès le début dans l'indicateur Duplex.

L'indicateur, soit 5 ml, rouge, vire au vert franc en milieu ammoniacal. On titre au fur et à mesure de la distillation par l'acide sulfurique N/10 jusqu'à coloration grise de l'indicateur.

Résultats.

Un ml d'acide sulfurique N/10 correspond à 0,0014 g d'azote. Soit n le nombre de ml d'acide sulfurique N/10, soit p le poids de substance minéralisée.

$n \times 0,1401$
————— en g d'azote total pour cent g de substance.

p

Le pourcentage d'azote total est à multiplier par 6,25 pour obtenir le pourcentage de Protéines.

Tous nos essais ont été effectués parallèlement avec une prise d'essai témoin d'urée.

	Principe actif en g	Azote total pour cent	Protéines pour cent
Askenzyme*	0,15	3,87	24,18
Assibiol bleu*	0,20	7,85	49,06
Assibiol rose*	0,10	5,08	31,72
Chymalgyl*	0,12	8,73	54,56
Chymoral*	0,14	8,39	52,43
Chymodrex*	0,16	8,08	50,50
Chymocycline*	0,11	10,39	64,93
Cotazym*	0,23	9,42	58,87
Enzypan*	0,15	6,53	40,81
Eupepsa*	0,06	7,09	44,31
Extranase*	0,16	0,90	5,62
Festale*	0,22	11,18	69,87
Flaviastase*	0,34 (comprimé)	4,06	25,38
Pancréanne C. ad*	0,15	7	43,75
Pancréanne C. e*	0,075	10,95	68,43
Pantozyme*	0,27	5	31,25
Pancrex*	0,20	12,16	76

Les résultats de Flaviastase* sont exprimés en g pour cent de comprimé et non de principe actif.

Quant à Hélicidine*, nous ne sommes pas en mesure de donner un résultat précis car la forme galénique de la préparation ne se prête pas à une minéralisation parfaite.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Dans l'esprit d'un grand nombre, les thérapeutiques, modernes quant à la nature des médicaments, doivent aller de pair avec des techniques d'administration également modernes. Ainsi la voie parentérale avec ses avantages bien connus : rapidité d'absorption, totalité du médicament absorbée, dose précise, meilleure constance des effets, voie digestive ménagée, tend ou tendrait à se substituer de plus en plus complètement à l'administration buccale. Cette dernière pourtant a été, de toute évidence, le procédé le plus simple mis en œuvre et mérite encore souvent d'être retenu, DASTUGUE (45).

Aussi bien le nombre des préparations enzymatiques destinées à l'administration buccale n'a d'égal que la diversité des méthodes mises en œuvre pour doser l'activité de chacune. Nos recherches nous ont permis d'en inventorier plusieurs et d'en retenir une plus particulièrement au point de vue expérimental.

Le problème se pose alors de juger ces préparations du point de vue pharmacologique pur, c'est-à-dire sans référence obligatoire à une activité thérapeutique qui pourra être appréciée sur d'autres plans, de doser leurs différentes activités enzymatiques et de voir comment des méthodes utilisées habituellement, soit sur le plan de la recherche fondamentale, soit sur le plan de l'enzymologie clinique, peuvent être adaptées au cas des préparations pharmaceutiques.

En considérant l'ensemble des résultats obtenus au cours de tous nos essais, nous avons constaté qu'il n'existe aucune relation proportionnelle dans l'activité enzymatique, en tenant compte des diverses dilutions ou des différents temps d'incubation. Ce fait est dû à la complexité des préparations utilisées qui ne peuvent manifestement pas avoir le même comportement qu'un produit hautement purifié.

Néanmoins nous avons pu observer que l'activité enzymatique, dans les cinq cas étudiés, décroît tandis que la dilution augmente.

C'est ainsi que, pour l'activité amylolytique de la préparation la plus active, le pourcentage de substrat hydrolysé le plus élevé, pour un temps d'incubation de trente minutes et pour une dilution au 1/50 000 est de 33 pour cent.

L'appréciation de l'activité benzoyl-arginine-éthyl-estérasique donne, pour un temps d'incubation de une heure et pour une dilution au 1/25 000, une activité de 43 pour cent, pour la préparation la plus active.

La préparation la plus active quant à l'activité caséinolytique pour un temps d'incubation de quatre-vingts minutes et une dilution au 1/25 000 donne un pourcentage d'hydrolyse de 15 pour cent.

En ce qui concerne l'activité cellulasique, pour un temps d'incubation de soixante minutes et une dilution au 1/5 000, le pourcentage de substrat hydrolysé est de 26 pour cent, pour la préparation la plus active.

Enfin le pourcentage de substrat hydrolysé donné lors de l'appréciation de l'activité lipolytique, pour le produit le plus actif, est de 21 pour cent, dans le cas d'une dilution au 1/50 000, pour un temps d'incubation de trois heures.

Si nous comparons nos résultats et surtout la manière dont nous les avons exprimés, à ceux publiés dans des cas analogues ou même précisés par diverses Pharmacopées, nous constatons qu'il s'agit d'un problème très complexe. En effet le dosage d'une enzyme n'est pas facilité dans la plupart des cas dès qu'il s'agit de milieux naturels, humeurs ou tissus, ou artificiels, préparations médicamenteuses entre autres; c'est pourquoi chaque préparation exige une adaptation particulière.

Aux questions posées par le grand nombre des méthodes viennent s'ajouter celles de la standardisation, et plus particulièrement de la standardisation des unités définissant l'activité enzymatique de chaque préparation, JACOBSEN (89). Chaque unité proposée, si elle semble s'inclure dans les données d'un cadre international, n'en reste pas moins très étroitement tributaire de la technique qui lui a donné naissance.

Nous pouvons remarquer ainsi un manque d'uniformité dans la définition des unités. Citons, à titre d'exemple, la Pharmacopée française qui impose simplement une valeur minimum: de 20 à 40 pour cent du poids d'amidon transformé en maltose, dans le cas du pouvoir amylolytique; 20 pour cent d'hydrolyse d'une solution de tributyrine, dans le cas de la mesure du pouvoir lipolytique; le titre d'une activité protéolytique doit être de 50.

On comprend donc que les instances internationales, notamment la F.I.P., comme il en a été encore à son dernier Congrès de Prague, en août 1965, s'emploient à édicter des méthodes de dosage et des systèmes d'expression standards des résultats qui permettront enfin des contrôles précis et des comparaisons intéressantes. Avec LAUWERS (101), nous pensons que l'uniformisation des systèmes d'unités à l'échelle internationale s'impose, et qu'il est essentiel d'avoir pour les préparations pharmaceutiques, des activités quantitativement comparables.



Vu,
Clermont-Ferrand, le 31 janvier 1966,

Le Président de Thèse :
G. DASTUGUE.

Vu et approuvé,
Clermont-Ferrand, le 1^{er} février 1966

Le Doyen de la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie :
G. MEYNIEL.

Vu et Permis d'Imprimer N° 6/66
Clermont-Ferrand, le 3 février 1966,

Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université :
E. LAPALUS.

BIBLIOGRAPHIE

1. ADAMS D.H. et WHITTAKER V.P. — *Biochem. J.* 44, 62, 1949.
2. AILHAUD G., SARDA et DESNUELLE P. — *Biochim. Biophys. Acta* (Amst) 59, 261, 1962.
3. AILHAUD G., SAMUEL D. et DESNUELLE P. — *Biochim. Biophys. Acta* (Amst) 67, 150, 1963.
4. AMMON R. — *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 233, 486, 1934.
5. ANSON M.L. — *J. Gen. Physiol.* 21, 19, 1938.
6. ANSON M.L. — *J. Gen. Physiol.* 22, 777, 1938.
7. ANSON M.L. — *J. Gen. Physiol.* 22, 79, 1938.
8. ANSON M.L. — *J. Gen. Physiol.* 22, 79, 1939.
9. ARCHIBALD R.H. — *J. Biol. Chem.* 165, 443, 1946.
10. ASTRUP T. et STERNDORFF I. — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 7, 239, 1955.
11. BALLADE CH. — Diplôme d'études supérieures de Biologie. Clermont-Fd. 1963.
12. BALLS A.K. et MATLACK M.B. — *J. Biol. Chem.* 122, 125, 1937.
13. BALLS A.K. et MATLACK M.B. — *J. Biol. Chem.* 125, 539, 1938.
14. BALLS A.K. et JANSEN E.F. — *Advances in Enzymologie* 13, 321, 1952.
15. BAMAN et MYRBACK. — *Methoden der Fermentforschung* 3, 2932, 1941.
16. BARBIERI A. de. VI. — Cong. Inter. Thérap. Strasbourg. Octob. 1959.
17. BASTIDE P. — Thèse Doctorat Etat Pharm. Strasbourg. Juin 1954.
18. BASTIDE P. et DASTUGUE G. — *Prod. et Prob. Pharm.* 19, 296, Juil. 1964.
19. BASTIDE P. — *Société de Pharmacie de Marseille.* 14, 191, 1955.
20. BASTIDE P., BAUDON J., CARCASSIN M. et DASTUGUE G. — *Biol. Med.* n° 5, 477, 1960.
21. BAUER C.W. et WILSON E.E. — *J. of the American Pharm. Assoc.* 36, 109, 1947.
22. BERGKVIST R. — *Acta Chimica Scandinavica.* 17, n° 6, 1963.
23. BICKEL G. VII. — Cong. Inter. Thérap. Genève. Octob. 1961.
24. BISERTE G. et ROUSSEL P. — *Ann. Biol. Clin.* 23, 391, 1965.
25. BLOM J. et ROSTED C.O. — *Acta Chim. Scand.* 1, 32, 1947.
26. BOISSONAS R.A. — *Helv. Chim. Acta.* 31, 1571, 1948.
27. BORGSTROM B. — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 9, 226, 1957.

28. BRITISH the PHARMACOPOEIA. — 1932 et 1938.
29. BROWN M.E. — *J. Labo. and Clin. Med.* 55, 616, 1960.
30. BRUSTIER V. — *Prod. et Prob. Pharm.* 19, 143, Av. 1964.
31. BULLOCK K. — *Quart. J. Pharm. Pharmacol.* 18, 234, 1945.
32. CARTER D.V. et SYKES G. — *J. of Pharm. and Pharmacol.* 13, n° 12, 1961 (Supplément).
33. CHERRY I.S. et CRANDALL L.A. — *Amer. J. Physiol.* 100, 266, 1932.
34. CHRISTIE R.B. — *Manufacturing Chemist.* 33, n° 7, 1962.
35. CIRELLI M.G. — *Delaware State Med.* 34, 159, 1962.
36. CLEMENT G. — *Vie Médicale.* 44, 103, 1963.
37. COHEN H., GRAFF M. et KLEINBERG W. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 4, 517, 1955.
38. COLBRAN et NEVELL. — *J. Chem. Soc.* 33, 2427, 1957.
39. COLOWICK S.P. et KAPLAN N.O. — *Method. in Enzymologie.* 2, 23, 1955.
40. COMFORT M.W. et OSTERBERG A.E. — *Med. Clin. N. Amer.* 24, 1137, 1940.
41. COURTOIS J.E. — *Ann. Biol. Clin.* 17, 551, 1959.
42. COURTOIS J.E. et BUI KHAC DIEP. — *Presse Médicale.* 73, 1311, 1965.
43. COURTOIS J.E. et BUI KHAC DIEP. — *Ann. Pharm. Franc.* 23, 533, 1965.
44. COURTOIS J.E. et BUI KHAC DIEP. — *Ann. Pharm. Franc.* 23, sous presse, 1965.
45. DASTUGUE G. — *Journées Médicales de France.* Vol. des Rapports. Page 409, 1956.
46. DASTUGUE G. et BASTIDE P. — *Ass. Franc. Avanc. Sci.* Caen. 1955.
47. DASTUGUE G., MIOCHE G. et BASTIDE P. — *Clermont Médical.* 15, 96, 1955.
48. DASTUGUE G., BAUDON J., BASTIDE P. et CARCASSIN M. — *Biol. Med.* n° 6, 571, 1960.
49. DAVID S., THIEBLOT L., BASTIDE P. et DASTUGUE G. — *C.R. Soc. Biol.* 154, 2276, 1960.
50. DASTUGUE G., BASTIDE P. et MARTIN G. — *Ann. Pharma. Fran.* 20, 367, Avr. 1962.
51. DASTUGUE G. et BASTIDE P. — *Clermont Médical.* 4, 13, 1963.
52. DELAUNAY A. — *Médecine et Hygiène.* 19, n° 518, 1961.
53. DE MOERLOOSE P. et RUYSSSEN R. — *Bolletino Chimico Farmac.* 101, 270, 1962.
54. DE MOERLOOSE P. et JOSSON-MERCKAERT L. — *J. de Pharm. de Belgique.* 18, 1963.
55. DE MOERLOOSE P., JOSSON-MERCKAERT L. — XXV Cong. Int. Sci. Pharm. FIP. Prague 24-27 août 1965.
56. DE MOERLOOSE P. et RUYSSSEN R. — *Cong. Inter. Pharm.* Pise 4-8 sept. 1961.
57. DESARMENIEN H. et BASTIEN C. — *Pharm. Acta Helvetiae.* 33, 583, 1958.
58. DESBORDES J. et GERMAIN A. — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 28, 194, 1946.
59. DESBORDES J. et GERMAIN A. — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 32, 100, 1950.
60. DESNUELLE P. — *Annales de Biologie Clinique.* Janv. 1964.
61. DESNUELLE P., CONSTANTIN M.J. et BALDY J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 37, 285, 1955.
62. DESNUELLE P. — *The Enzymes.* Vol. IV p. 130. Acad. Press. NY. 1960.
63. DINH VAN HOANG, ROVERY M. et DESNUELLE P. — *Biochim. Biophys. Acta.* 58, 613, 1962.
64. DIXON M. et WEBB E.L. — *Enzym.* Longmans London, page 252, 1958.

65. DUNCAN C.W. et MAMMERS. — *Biochem. J.* 63, 44, 1958.
66. ERIKSON F.V. et LINDVALLS. — *J. Pharm. and Pharmacol.* 11, 747, 1959.
67. FESTENSTEIN G.N. — *Biochem. J.* 69, 652, 1958.
68. FIGARELLA C., TAULIER J. et SARLES H. — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 47, 679, 1965.
69. FIORE J.V., NORD F.E. — *Arch. Biochem.* 26, 382, 1960.
70. FOLIN O. et CIOCALTEU V. — *J. Biol. Chem.* 73, 627, 1927.
71. FOLIN O. et WUH H. — *J. Biol. Chem.* 38, 106, 1919.
72. FRUTON J.S., WIGGANS D.S. et WINITZ M. — *Yale J. Biol. Med.* 27, 11, 1954.
73. GOLDSTEIN N.P. et ROE J.H. — *J. Lab. Clin. Med.* 28, 1368, 1943.
74. GONZALEZ C. — *Zbl Bakt.* 191, 556, 1963.
75. GOUNELLE J.C. — *Prod. et Prob. Pharm.* 19, 368, 1946.
76. GRASSMANN W. et HEYDE W. — *Z. Physiol. Chem.* 83, 425, 1929.
77. GROB D. — *J. Gen. Physiol.* 29, 219, 1946.
78. HAKALA et SCHWERT G.W. — *Biochim. Biophys. Acta.* 16, 489, 1954.
79. HALLIWELL G. — *Biochem. J.* 68, 605, 1958.
80. HALLIWELL G. — *Biochem. J.* 74, 457, 1960.
81. HANES C.S. et CATTLE M. — *Proc. Roy. Soc. London. B.* 125, 387, 1938.
82. HESTRIN S. — *J. Biol. Chem.* 180, 249, 1949.
83. HIRSCH P. — *Experiencia.* 10, 180, 1954.
84. HOFFMANN-OSTENHOF O. — *Advances in Enzymologie* 14, 219, 1953.
85. HUGGINS C. et RUSSELL P.S. — *Ann. Surg.* 128, 668, 1948.
86. HUMMEL B.C. — *Canad. J. Biochem. Physiol.* 37, 1393, 1959.
87. ISELIN B.M. et NIEMANN C. — *J. Biol. Chem.* 182, 821, 1950.
88. IWASAKI T. et Coll. — *J. Biochem, Tokyo.* 55, 30, 1964.
89. JACOBSEN E. et HALD J. — *Arch. Pharm. og Chemi.* 67, 1203, 1960.
90. JERMYN M.A. — *Austr. J. Sci. Res. B* 5, 409, 1952.
91. JOURNAL MONDIAL DE PHARMACIE. — 1, page 6, 1965.
92. KAMINSKI M. et TANNER C. — *Biochim. Biophys. Acta.* 33, 9, 1959.
93. KARRER P. — *Helv. Chim. Acta.* 5, 797, 1925.
94. KIBRICK A.C., ROGERS H.E. et SKUPP S. — *J. Biol. Chem.* 190, 107, 1951.
95. KUNITZ M. — *J. Gen. Physiol.* 18, 459, 1935.
96. KUNITZ M. — *J. Gen. Physiol.* 22, 207, 1939.
97. KUNITZ M. — *J. Gen. Physiol.* 30, 291, 1947.
98. KUNITZ M. — *Crystallin Enzymes*, page 309, 1948.
99. LAFILLE C. — *Prod. et Prob. Pharm.* 17, n° 6, 1962.
100. LAPORTE J.C. et TREMOLIERES J. — *C.R. Soc. de Biol.* 158, 971, 1964.
101. LAUWERS et RUYSSSEN. — *Jour. de Pharm. de Belg.* n° 1-2, pages 11-50, 1965.
102. LAZO-WASEM E. — *J. Pharmaceutical Sciences*, page 999, 1961.
103. LEGROS J. — *Acta Ped. Belg.* 5, 166, 1951.
104. LEVINSON M.S. et REESE E.T. — *J. Gen. Physiol.* 33, 601, 1950.
105. LINDERSTROM K.Z. — *Physiol. Chem.* 234, 294, 1959.
106. LOON VAN E.J., LIKINS M.R. et SEGER A.J. — *Amer. J. Path.* 22, 1134.
107. MAES R. — *Pharm. Tijdschrift voor België.* 39 n° 1, 1962.
108. MAINIL J. — *Ann Pharm. Fran.* 8, 734, 1950.
109. MARTIN G., SMYTH R. et BRENNAN R. — *Exp. Med. Surg.* Vol. 22, Fas. 1, 1964.
110. MARTIN C.J. et AXELROD A.E. — *J. Biol. Chem.* 234, 294, 1959.

111. MARTIN G.J., BRENDÉL R.L. et BEILER J.M. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 86, 636, 1954.
112. MATSCHER R. et LUPOC C. — *Boll. Soc. It. Sp.* 34, 567, 1958.
113. MENZIANI E. et SILVA A.M. — *Pharm. Acta Helv.* 33, 571, 1959.
114. MESNARD P. et Coll. — *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 102, 187, 1963.
115. MESNARD P., DEVAUX G., MONNIER M. et DANG R. — *Prod. et Prob. Pharm.* 18, 628, 1963.
116. METAIS P. — *Ann. Biol. Clin.* 22, 750, 1964.
117. MYRBACK K. et GJORLING L.G. — *Arkiv Kemi Mineral. Geol.* 20 A, n° 5, 1945.
118. MYRBACK K. et NEUMULLER G. — *The Enzymes.* 1, 668, 1950.
119. MYRBACK K. et AHLBORG K. — *Biochem. Z.* 307, 69, 1940.
120. NARDI G.L. — *J. Lab. Clin. Med.* 52, 66, 1958.
121. NARDI G.L. et LEES C.W. — *New Engl. J. Med.* 258, 797, 1958.
122. NATIONAL FORMULARY. — Onzième édition 1960, page 386.
123. NEURATH H. et SCHWERT G.W. — *Chem. Rev.* 46, 69, 1950.
124. NEURATH H., DIXON G.H. et PECHERE J.F. — *IV Cong. Int. Bioch. Vienne. Sept.* 1958.
125. NIELSEN E. — *Nature London.* 194, 89, 1962.
126. NORTHROP J.H. — *J. Gen. Physiol.* 16, 53, 1932.
127. NORTHROP J.H. et KUNITZ M. — *J. Gen. Physiol.* 16, 313, 1932.
128. NORTHROP J.H., KUNITZ M. et HERRIOT R. — *Crystalline Enzymes*, 1948.
129. PAGET M. et DELAISSE J. — *Ann. Biol. Clin.* 16, 223, 1958.
130. PARKS R.E. et PLAUT G.W. — *J. Biol. Chem.* 203, 755, 1953.
131. PENARANDA F. — *Ann. Biol. Clin.* 3-4, 319, 1961.
132. PENAU H. et GUILBERT J. — *J. Pharm. Chim.* 25, 5, 1937.
133. PESEZ M. et WILLEMART R. — *Ann. Pharm. Franc.* 11, 608, 1953.
134. PHARMACOPEE FRANÇAISE. — VII^e Edition. page 534, 1949.
135. PHARMACOPEE FRANÇAISE. — VII^e Edition. page 226, 1949.
136. PHARMACOPEE FRANÇAISE. — VII^e Edition. page 554, 1949.
137. PHARMACOPEE FRANÇAISE. — VIII^e Edition. page 294, 1965.
138. PHARMACOPEE FRANÇAISE. — VIII^e Edition. page 325, 1965.
139. PHARMACOPEE FRANÇAISE. — VIII^e Edition. page 699, 1965.
140. PHARMACOPEE FRANÇAISE. — VIII^e Edition. page 1240, 1965.
141. PHARMACOPEE FRANÇAISE. — VIII^e Edition. page 1590, 1965.
142. POLONOVSKI M. — *Traité de Biochimie Générale.* 1, 196, 1959.
143. QUEVAUVILLER A., MAINIL J. et GARCET S. — *Rev. Path. Génér. Comp.* n° 653, 1514, 1953.
144. RAVIN H.A., BERNSTEIN P. et SELIGMAN A.M. — *J. Biol. Chem.* 206, 1, 1954.
145. REPORT of the COMMI. on ENZYM. of the INTER. UNI. of BIOCHEM. — Pergamon Press Edit. London. 1961.
146. RICHTERICH R. — *Praxis.* 50, 1160, 1961.
147. RIEDEL A. et WUNSCH E. — *Z. Physiol. Chem.* 316, 61, 1959.
148. RONA P. et KLEINMANN H. — *Biochem. Z.* 174, 18, 1926.
149. RONA P. et LASNITZKI W. — *Biochem. Z.* 152, 504, 1924.
150. RONA P. et MICHAELIS L. — *Biochem. Z.* 31, 345, 1911.
151. ROTH M. — *Clin. Chim. Acta.* 8, 574, 1963.

152. RUYSSSEN R. — *Pharmac. Tijdschrift voor België*. 38, n° 11, 1961.
153. RUYSSSEN R. et LAUWERS A. — *Farmacia Bucarest*. 12, 391, 1964.
154. SAMMONS H.G., FRAZER A.C. et THOMPSON M. — *J. Clin. Pathol.* 9, 379, 1956.
155. SANDERGEN et ENEBOL. — *J. Inst. Brewing*. 58, 1952.
156. SARDA L. et DESNUELLE P. — *Biochim. Biophys. Acta (Amst)*. 30, 513, 1958.
157. SCHAPIRA G. — *Eléments de Biochimie Générale*. III^e Edition. 124, 1959.
158. SCHON H. et RASSLER B. — *Clin. Chim. Acta*. 6, 583, 1961.
159. SCHONHEYDER F. et VOLQUARTZ K. — *Biochem. Biophys. Acta*. 8, 407, 1952.
160. SCHWERT G.W. — *J. Biol. Chem.* 72, 221, 1948.
161. SCHWERT G.W. — *J. Biol. Chem.* 174, 411, 1948.
162. SCHWERT G.W., NEURATH H. et SMOKE J.L. — *J. Biol. Chem.* 172, 221, 1948.
163. SCHWERT G.W. et TAKENAKA Y. — *Biochim. Biophys. Acta*. 16, 570, 1955.
164. SCHWERT G.W., NEURATH H., KAUFMANS et SNOKE J.E. — *J. Biol. Chem.* 172, 221, 1948.
165. SELIGMAN A.M. et NACHLAS M.M. — *J. Clin. Invest.* 29, 31, 1950.
166. SIEGEL et EKANOW. — *J. of Pharmac. Sciences*, page 831, 1964.
167. SIMONNET H., THEVENOT R. et AUCLAIR M. — VII^e Cong. Inter. Théra. Genève. Oct. 1961.
168. SMITH B.W. et ROE J.H. — *J. Biol. Chem.* 179, 53, 1949.
169. SOBEL H. et MYERS S.M. — *J. Lab. Clin. Med.* 41, 655, 1953.
170. SOMOGYI M. — *J. Biol. Chem.* 125, 339, 1938.
171. SUMMER J.B. — *J. Biol. Chem.* 62, 287, 1925.
172. SUMMER J.B. et HOWELL O. — *J. Biol. Chem.* 108, 51, 1935.
173. THOMAS R. — *Austral J. Biol. Sci.* 9, 159, 1956.
174. THOMPSON R.H.S. — *Nature London*. 193, 4822, 1962.
175. TIETZ N.W., BORDEN T. et STEPPLETON J.D. — *Amer. J. Clin. Path.* 31, 148, 1959.
176. TRACEY M.V. — *Biochem. J.* 47, 431, 1950.
177. VAN SLYKE D.D. — *J. Biol. Chem.* 83, 425, 1929.
178. VINCENT D. et SEGONZAC G. — *Ann. Biol. Clin.* 9, 359, 1951.
179. WERLE E. et KAUFMAN B. — *Z. Physiol. Chem. Hoppe Seylers*. 319, 52, 1962.
180. WHISTLER et SMART. — *J. Amer. Chem. Soc.* 75, 1916, 1953.
181. WHITAKER D.R. — *Arch. Biochem. Biophys.* 43, 253, 1953.
182. WHITAKER D.R. — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 42, 1701, 1960.
183. WILLSTAETTER R. et MEMMEN F. — *Z. Physiol. Chem.* 129, 1, 1923.
184. WILLSTAETTER R., WALDSCHMIDT E. et MEMMEN F. — *Z. Physiol. Chem.* 125, 93, 1923.
185. WOHLGEMUTH J. — *Biochem. Z.* 9, 1, 1908.
186. ZINKER E.P. et REITHEL F.J. — *J. Lab. Clin. Med.* 34, 1312, 1949.



INDEX ALPHABÉTIQUE DES SPÉCIALITÉS ÉTUDIÉES

ASKENZYME

ASSIBIOL

CHYMALGYL

CHYMOCYCLINE

CHYMODREX

CHYMORAL

COTAZYM

ENZYPAN

EUPEPSA

EXTRANASE

FESTALE

FLAVIASTASE

HELICIDINE

PANCREANNE CELLULASE Adulte

PANCREANNE CELLULASE Enfant

PANCREX

PANTOZYME

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	15
PREMIERE PARTIE	
Chapitre I : Généralités	17
Chapitre II : Méthodologie	23
DEUXIEME PARTIE	
Chapitre I : Pouvoir amylolytique	25
Chapitre II : Pouvoir B.A.E. Estérasique	29
Chapitre III : Pouvoir caséinolytique	33
Chapitre IV : Pouvoir cellulasique	37
Chapitre V : Pouvoir lipolytique	43
TROISIEME PARTIE	
Chapitre I : Discussion	49
Chapitre II : Dosage de l'Azote total	57
RESUME ET CONCLUSIONS	61
BIBLIOGRAPHIE	65
INDEX ALPHABETIQUE DES SPECIALITES ETUDIEES	71

